



# Flow CAST<sup>®</sup> highsens

**Basophil Activation Test (BAT)  
Flow Cytometry**

FK-HSBAT 100 tests

Revision date: 2011-08-17

## ENGLISH

### INTENDED USE

The **Flow CAST® highsens** kit is a basophil activation test (BAT) which is intended to be used for the *in vitro* detection of immediate type allergic reactions and hypersensitivities against suspected allergens.

The test has been designed to determine the relative amount of CD63 and CD203c positive basophils from the total number of basophils (CCR3 positive) in whole blood by flow cytometry upon antigen stimulation.

### PRINCIPLE OF THE ASSAY

Stimulation Buffer and allergen are added to EDTA whole blood from suspected allergic/hypersensitive patients. The allergen mimics the *in vivo* reaction where specific IgE molecules bound to the cellular surface are bridged by the culprit allergen. This activates an intracellular signaling cascade leading to basophil activation. As a consequence, intracellular compounds bearing the trans-membrane protein CD63 are fused with the cellular membrane and therefore exposed to the extracellular matrix. In addition, the surface marker CD203c is up-regulated.

A highly specific monoclonal antibody binding to the high affinity IgE binding receptor (FcεRI) or the unspecific cell activator fMLP are used as positive controls.

During the stimulation reaction, Staining Reagent is added. The Staining Reagent contains a mixture of monoclonal antibodies to human CD63 and CD203c both labeled with the tandem dye PE-DY647, and a monoclonal antibody to CCR3 (CD193) labeled with phycoerythrin (PE). *In vivo*, CCR3 is constitutively expressed on eosinophils and basophils (Ref. 6,7,10) and therefore it is used as selection marker for basophilic cells.

Erythrocytes are removed by a lysing reaction and after a short centrifugation step the remaining cells are resuspended in Wash Buffer and analyzed by flow cytometry (*cf.* FLOW CYTOMETRIC DATA ACQUISITION on page 4).

### REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
<b>Stimulation Buffer</b> contains calcium and heparin	1 vial lyoph.	B-CCR-CSB	Reconstitute with 50 ml of water <sup>1)</sup>
<b>Stimulation Control</b> anti-FcεRI mAb	2 vials lyoph.	B-CCR-STCON	Reconstitute with 1.5 ml of B-CCR-CSB
<b>Stimulation Control</b> fMLP <sup>2)</sup>	2 vials lyoph.	B-CCR-FMLP	Reconstitute with 1.5ml of B-CCR-CSB
<b>Staining Reagent</b> Mix of anti-CD63-PE-DY647, anti-CD203c-PE-DY647 und anti-CCR3-PE mAb	1 vial 4.4 ml	B-HSBAT-SR	Ready to use
<b>Lysing Reagent</b> 10x concentrated	1 vial 25 ml	B-CCR-LYR	Dilute with 225 ml of deionized water <sup>1)</sup>
<b>Wash Buffer</b>	1 vial 100 ml	B-CCR-WB	Ready to use

Table 1

<sup>1)</sup> For required water quality, see Chapter Procedural Notes

<sup>2)</sup> N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

### STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened reagents	
Store at 2-8°C. Do not use past kit expiration date.	
Opened / reconstituted reagents	
Stimulation Buffer	Stable at -20°C for 6 months. Store in aliquots, if repeated use is expected.
Stimulation Control	
Stimulation Control fMLP	
Lysing Reagent	Stable at 2-8°C for 6 months.
Staining Reagent	Stable at 2-8°C until expiration date.
Wash Buffer	

Table 2

### ALLERGENS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Validated Allergens for the analysis in CAST® assays are offered by BÜHLMANN. Refer to the Allergen list on the webpage to obtain the respective order codes ([www.buhmannlabs.ch](http://www.buhmannlabs.ch)).

– **Protein Allergens** are shipped as concentrated liquids (1µl/vial) and must be diluted before use.

– **Drug and Chemical Allergens** are shipped lyophilized and must be reconstituted before use.

Refer to the BÜHLMANN Allergen Booklet and **Allergen Data Sheets** available on the website [www.buhmannlabs.ch](http://www.buhmannlabs.ch).

### ALLERGENS FROM OTHER SOURCES

Allergens from other sources might be used in the Flow CAST® assay with the following limitations:

- No matrix-bound allergens (solid or liquid phase).
- No allergen preparations containing cytotoxic compounds (stabilizers, preservatives) such as glycerol, phenol, sodium azide or merthiolate (thimerosal).

If you need assistance with the preparation allergens not provided by BÜHLMANN, please contact us or ask your local distributor.

### WARNINGS AND PRECAUTIONS

#### Reagents Containing Human Source Material:

Stimulation Buffer (B-CCR-CSB) contains components of human origin. Each serum used in the preparation was tested by an approved method and found negative for HBV surface antigen, HCV and HIV1/2 antibodies. Although those methods are highly accurate there is no guarantee that this material cannot transfer Hepatitis or AIDS. *Therefore all patient specimens and kit components should be handled as if capable of transmitting infections and reasonable precautions should be taken.*

### MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- K-EDTA venipuncture tubes.
- Centrifuge at 500 x g.
- Disposable, pyrogen-free polystyrene test tubes and appropriate test tube racks for the stimulation  
NOTE: Polystyrene tubes should fit with the Flow Cytometer used (e.g. 12 x 75 mm FALCON tubes from Becton Dickinson; order code: 352052).
- Vortex Mixer.
- Precision pipettes with disposable, pyrogen-free tips: 10-100 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml adjustable pipette and a 40-200 µl adjustable dispenser.

- Cylinder (50 ml) for preparing the Stimulation Buffer.
- Sterile, ultrapure and apyrogenic water for preparing the cell stimulation reagents (cf. Chapter Procedural Notes).
- Water bath set at 37°C.
- Distilled or deionized water as well as beaker or cylinder for the preparation of Lysing Reagent.
- Bottle-top dispensers for Lysing Reagent and Wash Buffer, respectively.
- Flow Cytometer instrument with 488 nm (blue) or 532 nm (green) excitation wavelength, equipped to detect Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC) and the two fluorochromes PE and PE-DY647 (analogue to PC5) including appropriate software (cf. chapter FLOW CYTOMETRIC DATA ACQUISITION).

### SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Collect sufficient blood in **K-EDTA venipuncture tubes**. Fill the venipuncture tubes up to the specified volume. In tubes filled < 75 %, the EDTA concentration in the sample is higher and thus false negative results may be obtained.

1 ml of whole blood is sufficient for about 9 tests.

Perform the cell stimulation immediately or store the blood sample refrigerated (2-8°C) for up to 48 hours. In order to be able to detect responses to drugs, use blood samples only for up to 24 hours after collection. **Do not centrifuge or freeze blood samples.**

### PROCEDURAL NOTES

- **RECOMMENDED WATER QUALITY TO BE USED FOR FLOW CAST<sup>®</sup> highsens.** The use of sterile, ultrapure and apyrogenic water for reconstituting Stimulation Buffer (B-CCR-CSB) is essential for good and reproducible basophil stimulation. The following sources of water may be used: Cell culture grade water, infusion grade water or deionized, double distilled water that is filtrated in a periodically sanitized 10 kDa ultra filter.

The Lysing Reagent (B-CCR-LYR) must be reconstituted with deionized, double distilled water or the same water quality that is used for the cell stimulation reagents.

- **PRECAUTIONS TO AVOID ALLERGEN CONTAMINATION DURING CELL STIMULATION.** Aeroallergens in the laboratory may contaminate open blood samples and cell suspensions from patients potentially causing an elevated background release. Therefore, care must be taken to cover blood samples and cell stimulation tubes. Avoid dust mites, pollinating plants, latex gloves or equipment potentially containing latex and open windows in the laboratory where the cell stimulation is performed. Therefore, we recommend carrying out the cell preparation and stimulation steps in a laminar flow hood.

### ASSAY PROCEDURE

1. Mix the anti-coagulated blood sample by inverting the venipuncture tube several times.
2. Prepare fresh and pyrogen-free 3.5 ml polystyrene tubes suitable for Flow Cytometry measurements.
3. For each patient, label the tubes e.g.:  
PB = patient background  
PC1 = stimulation control with anti-FcεRI Ab  
PC2 = stimulation control with fMLP  
A1-1 for allergen 1 with dilution 1  
A1-2 for allergen 1 with dilution 2  
etc.

### Stimulation and Staining

4. Pipet 100 µl of the following “stimulators” into each tube  
PB tube: 100 µl of **Stimulation Buffer (background)**  
PC1 tube: 100 µl of **Stimulation Control**  
PC2 tube: 100 µl of **Stimulation Control fMLP**  
Ax-y tube: 100 µl of **Allergen**

Repeat the sequence for each patient.

5. Add 200 µl of Stimulation Buffer to each tube.
6. Add 100 µl of patient’s whole blood to each tube. Be sure that the side wall and top of the tube are free of blood.
7. Mix gently.
8. Add 40 µl of Staining Reagent to each tube.
9. Mix gently but thoroughly, cover the tubes and incubate for 15 minutes at 37°C in a **water bath**. (using an incubator will take about 10 minutes longer incubation time due to less efficient heat transfer).

### Lysing

10. Add 2 ml Lysing Reagent, adjusted to 18-28 ° C, into each tube, mix gently.
11. Incubate for 5-10 minutes at 18-28°C.
12. Centrifuge the tubes for 5 minutes at 500 x g.
13. Decant the supernatant by using blotting paper.
14. Resuspend the cell pellet with 200 µl of Wash Buffer.

**Note:** Depending on Flow cytometry instrumentation, it might be necessary to increase the Wash Buffer volume (e.g. 800 µl).

15. Vortex gently.
16. Acquire the data on the flow cytometer within the same day. If the samples are stored for several hours before the analysis (<16 h) they should be kept protected from light at 2-8°C.

## FLOW CYTOMETRIC DATA ACQUISITION

Flow cytometric acquisition can be performed on any flow cytometer working with a 488 nm argon laser diode (blue excitation light) or a 532 nm green laser diode.

The flow cytometer must be equipped with Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC), and suitable detection channels for the fluorochromes PE and PE-DY647 (analogue to PC5).

Ensure that the flow cytometer is properly aligned and colour compensation is set.

During data acquisition of samples, make sure that the leukocyte population is separated into three discrete populations on the FSC/SSC histogram. Adjust the amplification (gain) of FSC and SSC signals to obtain a cell distribution the one shown in Figure 1. Refer to the flow cytometer manual for further information.

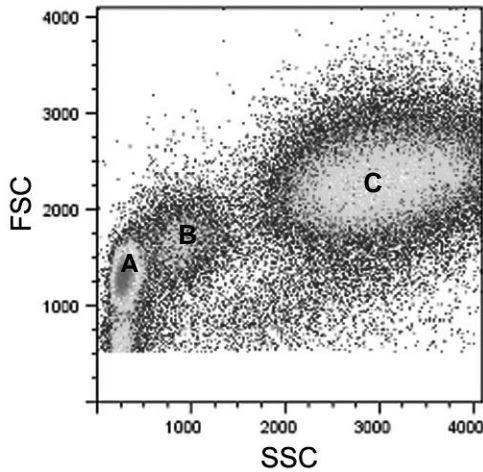


Figure 1: Three discrete populations for lymphocytes (A), monocytes (B) and granulocytes (C) in FSC/SSC histogram.

Typically, the acquisition can be stopped, after having acquired 800-1000 basophilic cells (gated as shown in figure 2). At least 300 basophilic cells must be analyzed to obtain reliable results. This requires a total amount of 100'000-200'000 leukocytes per sample to be acquired.

The analysis of allergies to drugs is more difficult, because the activation of basophils in these patients is lower than in patients suffering from other allergies (e.g. to pollen allergens). Thus the lower limit of basophilic cells to be analyzed should be set to 800. We recommend each laboratory define its own confidence limits.

## DATA ANALYSIS

The analysis of acquired data can be performed with any flow cytometry analysis software like FlowJo, FloMax, CellQuest or others.

The analysis is done in two steps:

1. Include the entire basophil population  $CCR3^{pos}$  by setting the gate R1 with the low Side Scatter  $SSC^{low}$ . Eosinophils located at  $SSC^{high}$  position (upper right side) will be excluded (refer to Figure 2).
2. Display the cells selected in R1 in a graph with CCR-PE on the x-axis and CD63+CD203c-PE-DY647 on the y-axis. Set a quadrant gate so that the ratio of cells in the upper right quadrant for the base activation (PB-tube) is between 2.0 and 2.5% of the total number of basophilic cells gated in R1 (Figure 3).

**Note:** Set a new quadrant threshold for each patient. Once the quadrant has been defined by measuring the patient background (PB), use the same quadrant settings for

the analysis of the other tests to be carried out with the respective patient sample (positive controls and allergens. Refer to Figure 4.

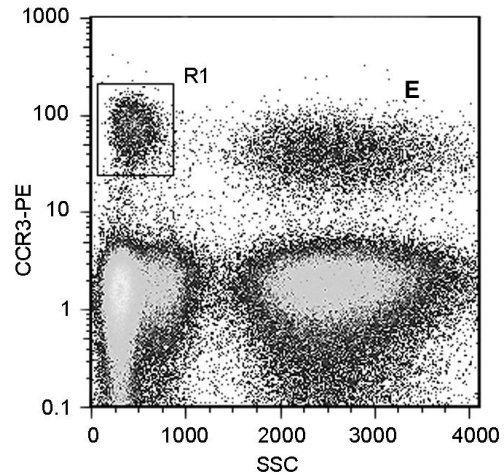
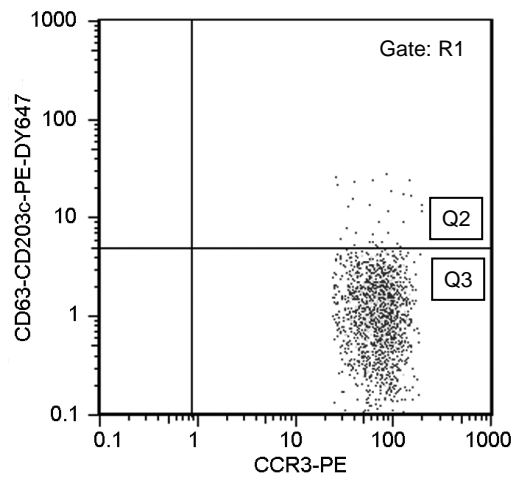
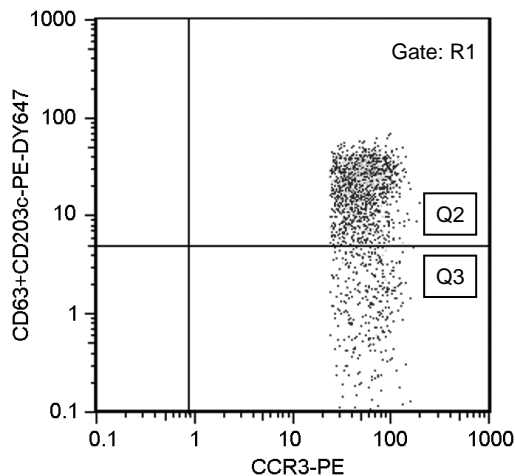


Figure 2: Selection of basophilic cells (R1)  $CCR3^{pos} / SSC^{low}$



Gated Region	Count (n=)	%
Total	152483	
R1	1560	100.0
Q2 (CD63+CD203c <sup>pos</sup> )	33	2.1
Q3 (CD63+CD203c <sup>neg</sup> )	1527	97.9

Figure 3: Patient Background (PB) with CSB only



Gated Region	Count (n=)	%
Total	156543	
R1	1504	100.0
Q2 (CD63+CD203c <sup>pos</sup> )	1221	81.2
Q3 (CD63+CD203c <sup>neg</sup> )	283	18.8

Figure 4: Stimulation Control (STCON)

## LIMITATION

- Flow cytometry may produce false results if the cytometer has not been aligned properly, if the fluorescence emission has not been correctly compensated and if the gating regions have not been carefully positioned.
- Verify the preparations by eye to assess the efficacy of lysis. The erythrocytes may be incompletely lysed and appear on a light diffraction histogram in the same location as the lymphocytes.

## QUALITY CONTROL

For the appropriate evaluation of results, different values should be taken into account:

- Typically, three distinct **leukocyte populations** lymphocytes, monocytes and granulocytes appear in the FSC/SSC plot. Their occurrence can be regarded as a criterion for the quality of the blood sample (time of collection, storage).
- Negative control** (buffer control): A patient individual base value of 2.0 to 2.5 % of the activated basophils should be regarded as negative. This was also basis for the determination of allergen specific cut-off's.
- Positive control** (stimulation control). Two different positive controls are included in the kit. **Anti-FcεRI mAb** mimics the bridging of the receptor *in vivo* caused by the allergen. **fMLP** is a tripeptide causing basophil activation in a non-immunologic way. If one of those two stimulators shows activation of **>10%** basophils, the sample is evaluable.
- Non-responders** are persons with a low reactivity (<10% CD63+CD203c positive cells) to fMLP and anti-FcεRI antibody. Evaluation of data from normal blood donors and patients showed that 6.0% (out of n=116) were non-responders to anti-FcεRI and 2.9% (out of n=70) to fMLP.

## INTERPRETATION OF THE RESULTS

To obtain an optimal sensitivity and specificity, slightly different cut-off values should be applied for different groups of allergens. Based on numerous studies and evaluations BÜHLMANN recommends using the following cut-off values:

Inhalant allergens:	≥15%	
Food allergens:	≥15%	
Hymenoptera venoms:	≥10%	
Betalactams*:	≥5%	SI ≥2
Analgesics*:	≥5%	SI ≥2
Food additives*	≥5%	SI ≥2

\* Drugs and other chemical allergens usually results in lower activation percentages than other allergens. Therefore, a lower cut-off should be taken, but the stimulation index (SI = allergen stimulation divided by negative control) must be equal or higher than 2 in order to consider the result as positive.

BÜHLMANN allergens have been validated. Individual cut-offs have been established in studies or internal evaluations. For details refer to the allergen data sheet on the BÜHLMANN website, [www.buhmannlabs.ch](http://www.buhmannlabs.ch).

## ASSAY PERFORMANCE

**Specificity:** The anti-CCR3 mAb is a highly specific antibody (Refs 6 and 7). CCR3 is constitutively expressed on eosinophilic and basophilic leukocytes (see Fig. 2) and in a smaller part on CD3<sup>+</sup> cells (lymphocytes). Samples from eight normal blood donors were double stained twice with anti-CCR3-PE and anti-CD3-AF647. The relative

amount (mean) of CD3<sup>+</sup> cells within the gated Basophil population was 3.9% (cf Table 3).

n	16
Mean	3.85%
95 <sup>th</sup> percentile	1.93 – 5.41%

Table 3: Specificity The relative amount (mean) of CD3<sup>+</sup> cells within the gated Basophil population.

**Basophil Yield:** After the lysing step, cells from 43 normal blood donors were resuspended in 250 µl of wash-buffer and counted from a 100 µl aliquot of this cell suspension by using Partec PAS Flow Cytometer connected to Partec RobbyWell automate. The mean Basophil yield was 958 cells (95<sup>th</sup> percentile 310 to 2336 basophils).

**Precision:** A precision profile was calculated from differently stimulated blood samples (n=20). Each sample was incubated 12 times with stimulation buffer or stimulation control and consecutively analyzed by flow cytometry. The results are expressed as coefficient of variation (%CV) and plotted against % activation (CD63+CD203c<sup>POS</sup>). The precision profile is shown in Figure 5. At basophil activation above 10% the CV is below 15%.

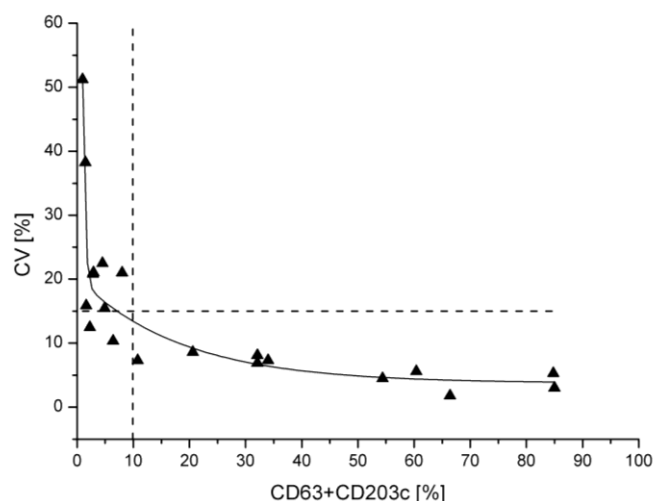


Figure 5: Precision profile

**Inter Technician Variation: 6.1 - 11.7 % CV.** Two blood samples from asymptomatic blood donors were tested by six different technicians in two different labs within the same day. Both positive controls included in the kit, STCON and fMLP were used. The results are expressed in Table 4.

	Sample1 (%CD63+CD203c <sup>POS</sup> )		Sample2 (%CD63+CD203c <sup>POS</sup> )	
	STCON	FMLP	STCON	FMLP
Mean	81.1	58.0	83.5	69.5
SD	5.57	6.80	5.88	4.24
<b>%CV</b>	<b>6.9%</b>	<b>11.7%</b>	<b>7.0%</b>	<b>6.1%</b>

Table 4: Inter Technician Variation

**Reference Intervals** were established with normal blood donors (age 18-60). Median value for anti-FcεRI stimulated samples is 71.1% (percentile 25<sup>th</sup>: 38.1 %, 75<sup>th</sup>: 85.8%). Median value for fMLP stimulated samples is 45.7 % (percentile 25<sup>th</sup>: 30.0 %, 75<sup>th</sup>: 59.7%). Refer to Table 5.

	n	%CD63+CD203c <sup>POS</sup>		
		Median	2.5 <sup>th</sup> – 97.5 <sup>th</sup> percentile	25 <sup>th</sup> – 75 <sup>th</sup> percentile
STCON	116	71.1	3.4 – 97.9	38.1 – 85.8
fMLP	70	45.7	8.9 – 89.4	30.0 – 59.7

Table 5: Reference intervals

**Interferences:** It is recommended patients avoiding systemically administered antiallergenic drugs such as corticosteroids, chromoglycic acid (DSCG) for at least 24 hours prior to blood sampling.

EDTA and **Antihistamine drugs** listed in Table 6 were evaluated according the approved CLSI guideline for interference testing EP7-A2 (Ref. 8). No interference has been observed for antihistamines up to the listed concentrations (Ref. 9). High concentration of **EDTA** inhibits the expression of CD63 and CD203c thus may lead to lower activation values. Not completely filled venipuncture blood collection tubes leads to higher concentration of EDTA. Filling grade less than 50% leads to inhibition of about 40% of the maximal possible activation. Refer to Table 7.

Drug	Active component	No interference up to	
Telfast®	Fexofenadin	1.9	µg/mL
Aerius®	Des-Loratadin	4.0	µg/mL
Claritin®	Loratadin	0.017	µg/mL
Cetirizin-Teva®	Cetirizin	1.5	µg/mL
Xyzal®	Levo-Cetirizin	1.4	µg/mL

Table 6: Interference of antihistamine drugs

Tube filling-level	vol (mL)	Conc. EDTA (mg/mL)	Recovery
1/1	9	1.8	<b>100%</b>
3/4	6.75	2.4	<b>100%</b>
1/2	4.5	3.6	<b>61%</b>
1/4	2.25	7.2	<b>11%</b>
1/9	1	16.2	<b>9%</b>

Table 7: Interference of EDTA simulation of a “short draw”

## DEUTSCH

### ANWENDUNGSZWECK

Der **Flow CAST® Highsens** ist ein Basophilen Aktivierungstest (BAT) und kann für die in vitro Bestimmung von Direkttyp Allergien und Hypersensitivitäten gegen vermutete Allergene verwendet werden.

Der Test wurde entwickelt, um nach Stimulation mit Allergenen die relative Anzahl CD63 und CD203c positiver basophiler Zellen (CCR3 positiv) aus der Gesamtzahl der Basophilen in Vollblut durchflusszytometrisch zu bestimmen.

### PRINZIP DER METHODE

Stimulationspuffer und Allergen werden zu EDTA Vollblut von potentiell allergischen/überempfindlichen Patienten gegeben. Durch das Allergen wird die *in vivo* Reaktion simuliert, bei der auf der Zelloberfläche gebundene, spezifische IgE Moleküle mit dem auslösenden Allergen verbunden werden. Dadurch wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die zu einer Basophilenaktivierung führt. Als Konsequenz fusionieren intrazelluläre Komponenten, die das membrangebundene Protein CD63 tragen mit der Zellmembran und werden deshalb in die extrazelluläre Matrix exponiert. Ausserdem wird der Oberflächenmarker CD203c hoch-reguliert.

Als Positivkontrollen werden ein spezifischer monoklonaler Antikörper, der den hochaffinen IgE bindenden Rezeptor (FcεRI) erkennt oder N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), ein unspezifischer Zellaktivator, verwendet.

Während der Stimulierung, wird Farbe-Reagenz zugefügt. Das Farbe-Reagenz besteht aus einer Mischung aus monoklonalen Antikörpern gegen humanes CD63 und CD203c, die beide mit dem Tandem-Färbereagenz PE-DY647 markiert sind und einem monoklonalen Antikörper gerichtet gegen CCR3 (CD193) der mit Phycoerythrin (PE) markiert ist. *In vivo* wird CCR3 auf Eosinophilen und Basophilen konstitutiv exprimiert (Ref. 6, 7, 10) und wird deshalb als Selektionsmarker für basophile Zellen eingesetzt.

Die enthaltenen Erythrozyten werden durch eine Lyse-Reaktion entfernt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt werden die Zellen in Waschpuffer resuspendiert und können danach durchflusszytometrisch analysiert werden (siehe Analyse mit Durchflusszytometer, Seite 9).

### GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
<b>Stimulationspuffer</b> enthält Kalzium, Heparin	1 vial lyoph.	B-CCR-CSB	Mit 50 ml H <sub>2</sub> O <sup>1)</sup> lösen
<b>Stimulations-Kontrolle</b> anti-FcεRI mAk	2 vials lyoph.	B-CCR-STCON	Mit 1.5 ml B-CCR-CSB lösen
<b>Stimulations-Kontrolle fMLP</b> <sup>2)</sup>	2 vials lyoph.	B-CCR-FMLP	Mit 1.5 ml B-CCR-CSB lösen
<b>Farbe-Reagenz</b> Mischung von anti-CD63-PE-DY647, anti-CD203c-PE-DY647 and anti-CCR3-PE mAb	1 vial 4.4 ml	B-HSBAT-SR	Gebrauchsfertig
<b>Lyse-Reagenz</b> 10 x konzentriert	1 vial 25 ml	B-CCR-LYR	Mit 225 ml deion. Wasser <sup>1)</sup> verdünnen
<b>Waschpuffer</b>	1 vial 100 ml	B-CCR-WB	Gebrauchsfertig

Tabelle 1

<sup>1)</sup> Für die verlangte Wasserqualität siehe Kapitel Technische Hinweise.

<sup>2)</sup> N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Penylalanin

### LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Bei 2-8°C lagern. Zu verwenden bis zum Verfallsdatum, angegeben auf der Packungsetikette.	
Geöffnete / Rekonstituierte Reagenzien	
Stimulations-Puffer	6 Monate bei -20°C haltbar. Bei wiederholtem Gebrauch aliquotieren.
Stimulations-Kontrolle	
Stimulations-Kontrolle fMLP	
Lyse-Reagenz	6 Monate bei 2-8°C haltbar.
Färbe-Reagenz	Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar.
Wasch-Puffer	

Tabelle 2

### ALLERGENE ERHÄLTlich AUF ANFRAGE

**Validierte Allergene werden von BÜHLMANN zum Einsatz in CAST® Assays angeboten. Die entsprechenden Art.-Nummern sind auf der BÜHLMANN Allergenliste auf der Internetseite: [www.buhlmannlabs.ch](http://www.buhlmannlabs.ch) aufgeführt.**

- **Proteinallergene:** Die BÜHLMANN Proteinallergene wurden bezüglich der Qualität kontrolliert und werden in flüssiger, konzentrierter Form (1µl/Röhrchen) versandt. Die Proteinallergene müssen gekühlt gelagert werden und werden vor Gebrauch verdünnt.
- **Medikamente und chemische Allergene:** niedermolekulare Allergene von BÜHLMANN werden in lyophilisierter Form versandt. Diese Allergene müssen gekühlt gelagert werden und werden vor Gebrauch gelöst.

Weitere Infos, siehe BÜHLMANN Allergen-Broschüre und **Allergendatenblätter** publiziert auf der BÜHLMANN Webseite, [www.buhlmannlabs.ch](http://www.buhlmannlabs.ch).

### ALLERGENE ANDERER HERKUNFT

Allergenextrakte anderer Herkunft können mit den nachfolgenden Einschränkungen im Flow CAST® Test verwendet werden:

- Keine Matrix-gebundene Allergene (fest oder flüssig).
  - Keine Allergen-Präparationen mit zytotoxischen Chemikalien (Stabilisatoren und Konservierungsstoffe) wie Glycerin, Phenol, Natriumazid oder Merthiolat (Thimerosal).
- Eine Anleitung zur Etablierung von Anwender spezifischen Allergenen ist auf Anfrage beim lokalen Distributor oder bei BÜHLMANN erhältlich.

### WARNUNG UND VORSICHTSMASSNAHMEN

**Reagenzien mit humanem Material:**  
Stimulationspuffer (B-CCR-CSB) enthalten Komponenten menschlichen Ursprungs. Jedes Serum das in der Produktion verwendet wurde, wurde mit einer zugelassenen Methode getestet und als negativ für HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper getestet. Auch wenn diese Methoden hochpräzise sind, kann eine Übertragung von Hepatitis oder AIDS durch diese Materialien nicht vollständig ausgeschlossen werden. *Deshalb müssen alle Kitkomponenten und Patientenproben als infektiös betrachtet werden und müssen mit den entsprechenden Vorsichtsmassnahmen behandelt werden.*

## ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT MITGELIEFERT WERDEN

- K-EDTA Blutentnahme Röhrchen.
- Zentrifuge für 500 x g.
- Pyrogen-freie Versuchsröhrchen aus Polypropylen oder Polystyrol, mit einem entsprechenden Halter  
HINWEIS: Die Polystyrol-Röhrchen sollten mit dem verwendeten Durchflusszytometer kompatibel sein (z.B. 12 x 75 mm FALCON Röhrchen von Becton Dickinson; Art.-Nr.: 352052).
- Vortex Mischer.
- Präzisionspipetten mit Pyrogen-freien Einwegspitzen für 10-100 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml, sowie eine 40-200 µl Multipipette.
- Zylinder (50 ml) zur Vorbereitung des Stimulationspuffers.
- Ultrareines und Pyrogen-freies Wasser für die Vorbereitung des Stimulations-Puffers (siehe technische Hinweise).
- Wasserbad auf 37°C eingestellt.
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser und Becherglas oder Zylinder zur Vorbereitung des Lyse-Reagenz.
- Flaschenaufsatzdispenser für Lyse-Reagenz und Wasch-Puffer.
- Durchflusszytometer mit Anregungswellenlänge von 488 nm (blau) oder 532 nm (grün), um Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC) und die zwei Fluorochrome PE und PE-DY647 (analog zu PC5) mit Hilfe einer geeigneten Software zu detektieren (siehe Kapitel „Analyse mit Durchflusszytometer“).

## UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Ausreichend Blut in **K-EDTA-Röhrchen** sammeln. Das Entnahmeröhrchen bis zur angegebenen Markierung füllen. Nicht ausreichend gefüllte Röhrchen (Füllmenge <75%) ergeben eine erhöhte EDTA Konzentration was zu falsch negativen Resultaten führen kann.

1 ml EDTA Vollblut reicht für ungefähr 9 Ansätze.

Die Zellstimulation sofort durchführen oder die Blut-Proben bei 2-8°C bis zu 48 Stunden aufbewahren. Für den Nachweis von Medikamentenreaktionen sollte das Blut nicht älter als 24 Stunden sein. **Blutproben nicht zentrifugieren oder einfrieren.**

## TECHNISCHE HINWEISE

- EMPFOHLENE WASSERQUALITÄT FÜR DEN FLOW CAST®. Die Verwendung von ultrareinem und pyrogenfreiem Wasser zur Rekonstitution des Stimulations-Puffers (B-CCR-CSB) ist notwendig, um eine gute und reproduzierbare Stimulation der Basophilen zu erreichen. Folgende Wasser-Qualitäten können verwendet werden: Wasser zur Zellkultur, Wasser für Injektionszwecke oder deionisiertes Wasser, das zweimal destilliert und durch einen regelmässig dekontaminierten 10 kDa Ultrafilter gereinigt wurde.  
Zur Rekonstitution des Lyse-Reagenz (B-CCR-LYR) eignet sich deionisiertes, zweifach destilliertes Wasser. Auch das für die Reagenzien der Zellstimulation bestimmte pyrogenfreie Wasser kann verwendet werden.
- VERMEIDUNG VON KONTAMINATIONEN WÄHREND DER ZELL-STIMULATION. In der Laborluft enthaltene Aeroallergene können offene Blutproben und Zellsuspensionen kontaminieren und so potentiell zu einem erhöhten Basiswert führen. Alle verwendeten Blutproben und Röhrchen, die zur Stimulation verwendet werden sollten

daher stets abgedeckt werden. Auch evtl. vorhandene Hausstaubmilben oder blühende Zimmerpflanzen und offene Fenster im Labor, in dem die Zellstimulation durchgeführt wird, sind als potentielle Allergenquellen zu berücksichtigen. Wir empfehlen daher, die Zellpräparation und die Stimulationsschritte unter einem Laminar Flow Modul durchzuführen.

## TESTDURCHFÜHRUNG

1. Die Blutprobe durch mehrmaliges Invertieren des Blutentnahmeröhrchens mischen.
2. Frische und pyrogen-freie 3.5 ml Polystyrol Röhrchen für die flowzytometrische Messung.
3. Für jeden Patienten, Röhrchen folgendermassen beschriften: z.B.:  
PB            Patienten Basis  
PC1          Stimulationskontrolle mit anti-FcεRI  
PC2          Stimulationskontrolle mit fMLP  
A1-1        Allergen 1 mit Konzentration 1  
A1-2        Allergen 1 mit Konzentration 2 etc.

### Stimulation und Färbung

4. 100 µl des entsprechenden Stimulus zu jedem Röhrchen für jeden Patienten zugeben.  
PB Röhrchen    100 µl **Stimulations-Puffer**  
PC1 Röhrchen   100 µl **Stimulations-Kontrolle**  
PC2 Röhrchen   100 µl **Stimulations-Kontrolle fMLP**  
Ax-y Röhrchen   100 µl **Allergen**

Wiederholen Sie diese Sequenz für jeden Patienten.

5. 200 µl Stimulations-Puffer in jedes Röhrchen geben.
6. 100 µl EDTA-Vollblut von jedem Patienten in die entsprechenden Röhrchen zugeben. Sicherstellen, dass die Seitenwand und der obere Teil des Röhrchens nicht mit Blut kontaminiert sind.
7. Vorsichtig mischen.
8. 40 µl Farbe-Reagenz zu jedem Röhrchen zugeben.
9. Vorsichtig mischen. Röhrchen zudecken und für 15 Minuten bei 37°C in einem **Wasserbad** inkubieren (wird ein Inkubator verwendet, muss aufgrund schlechterer Wärmeübertragung, 10 Minuten länger inkubiert werden).

### Lyse

- 10.2 ml vorgewärmtes (18-28°C) Lyse-Reagenz zu jedem Röhrchen zugeben, vorsichtig mischen.
  - 11.5-10 Minuten bei 18-28°C inkubieren.
  12. Röhrchen für 5 Minuten bei 500 x g zentrifugieren.
  13. Überstand vorsichtig dekantieren und mit saugfähigem Papier den Röhrchenrand trocknen.
  14. Zellpellet mit 300 µl Wasch-Puffer suspendieren.
- Hinweis:** Abhängig vom verwendeten Durchflusszytometer könnte ein größeres Volumen Wasch-Puffer (z.B. 800 µl) benötigt werden.
15. Vorsichtig vortexen.
  16. Datenerhebung auf dem Durchflusszytometer sollte innerhalb des gleichen Tages erfolgen. Werden die Proben für mehrere Stunden gelagert, sollten diese in Dunkelheit bei 2-8°C aufbewahrt werden.

## ANALYSE MIT DURCHFLUSSZYTOMETER

Die Analyse kann mit jedem Durchflusszytometer, das mit einer 488 nm Argonlaser-Diode (blaues Exitationslicht) oder einer grünen Laser Diode bei 532 nm ausgerüstet ist. Das Durchflusszytometer muss mit Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC) und mit geeigneten Kanälen für die Fluorochrome PE and PE-DY647 (analog für PC5) ausgerüstet sein.

Es muss sichergestellt werden, dass das Durchflusszytometer richtig eingestellt ist und eine Farbkompensation durchgeführt wurde.

Während der Datenerhebung muss sichergestellt werden, dass auf einem FSC/SSC Histogramm die Leukozytenpopulation in drei separate Populationen aufgetrennt werden. Um eine Populationsverteilung wie in Abbildung 1, Seite 9, dargestellt zu erhalten, muss die Amplifikation (Gain) des FSC und SSC Signals gegebenenfalls angepasst werden. Siehe auch Produktbeschreibung/Anleitung des Durchflusszytometers.

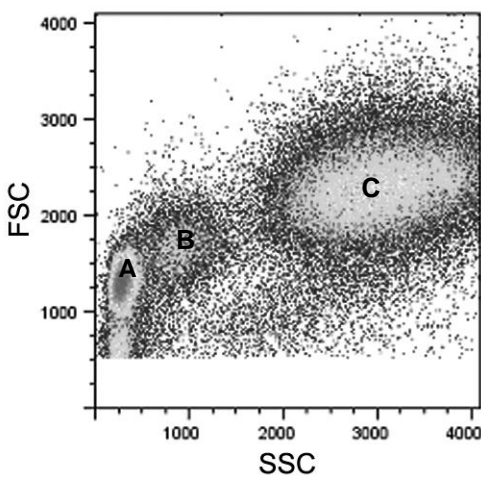


Abb. 1: Drei diskrete Zellpopulationen Lymphozyten (A), Monozyten (B) und Granulozyten (C) im FSC/SSC Histogramm.

Normalerweise kann die Datenerhebung nach ungefähr 800-1000 basophilen Zellen gestoppt werden. Mindestens 300 basophile Zellen müssen analysiert werden, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Dazu müssen gesamthaft 100'000-200'000 Leukozyten pro Probe gesammelt werden (Gate R1 in Abbildung 2).

Die Analyse von Medikamentenallergien ist schwieriger, weil die Basophilenaktivierung in diesen Patienten niedriger ist als bei Patienten, die unter anderen Allergien leiden (z.B. unter Pollenallergien). Deshalb sollten mindestens 800 Basophile gesammelt werden. Wir empfehlen, dass jedes Labor seine eigenen Grenzen festlegt.

## DATENANALYSE

Die Datenanalyse der erhobenen Daten kann mit jeder geeigneten Software für Durchflusszytometer durchgeführt werden, z.B. FlowJo, FloMax, CellQuest oder andere.

Die Analyse besteht aus zwei Schritten:

1. Ein Fenster 1 (Gate R1) so setzen, dass die gesamte Population der  $CCR3^{pos}$  Basophilen mit tiefem Side Scatter  $SSC^{low}$  eingeschlossen ist (Abbildung 2). Die Population der Eosinophilen, welche auf der oberen rechten Seite ( $SSC^{high}$ ) liegt, wird dabei ausgeschlossen.

2. Die in Fenster R1 selektierten Zellen in einer Graphik mit CCR-PE auf der x-Achse und CD63+CD203c-PE-DY647 auf der y-Achse darstellen. Ein Quadranten Gate so setzen, dass die Anzahl der Zellen im oberen rechten Fenster Q2 für die Basisaktivierung (PB Röhrrchen) zwischen 2.0 und 2.5% der Gesamtzahl der Basophilen (R1) beträgt (siehe Abbildung 3).

**Bemerkung:** Für jeden Patienten die horizontale Linie des Quadranten neu setzen. Wenn der Quadrant durch den Patientenbackground definiert worden ist, werden die gleichen Settings benutzt, um die übrigen Proben des Patienten zu analysieren (Positiv Kontrollen und Allergene (siehe Abbildung 4)).

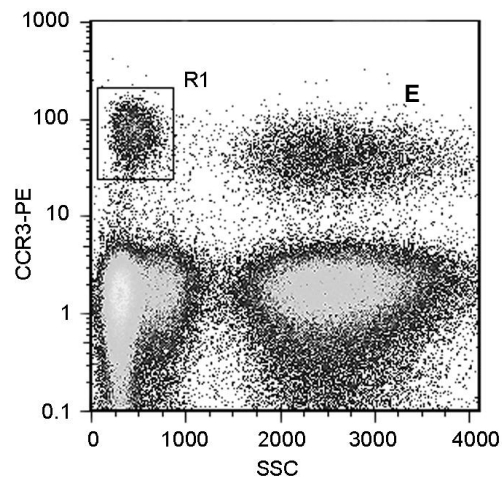
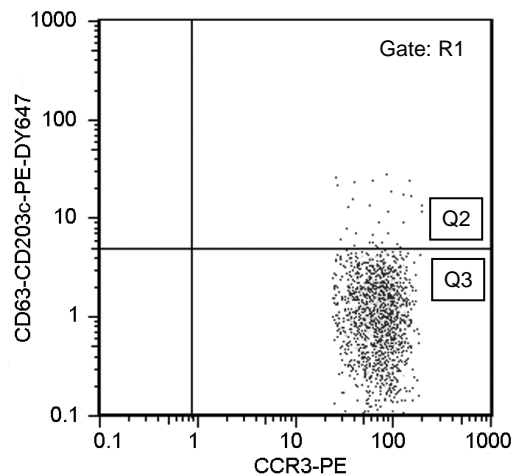
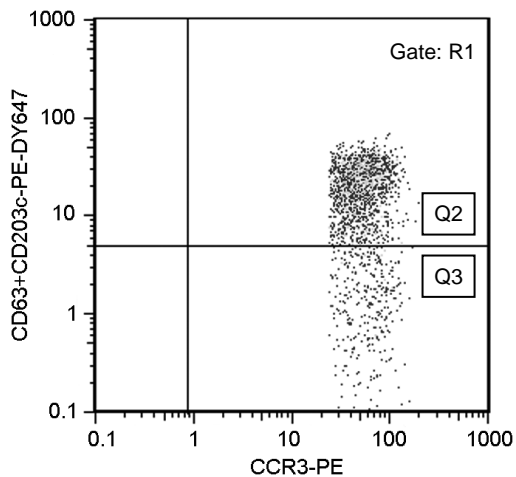


Abb. 2: Selektion der basophilen Zellen (R1)  $CCR3^{pos} / SSC^{low}$



Selektierte Region	Zellzahl (n=)	%
Total	152483	
R1	1560	100.0
Q2 (CD63+CD203c <sup>pos</sup> )	33	2.1
Q3 (CD63+CD203c <sup>neg</sup> )	1527	97.9

Abb. 3: Patienten Background (PB) nur mit CSB



Gated Region	Count (n=)	%
Total	156543	
R1	1504	100.0
Q2 (CD63+CD203c <sup>pos</sup> )	1221	<b>81.2</b>
Q3 (CD63+CD203c <sup>neg</sup> )	283	18.8

Abb. 4: Stimulation-Kontrolle (STCON)

### EINSCHRÄNKUNGEN

- Durchflusszytometrie kann falsche Resultate liefern, wenn das Gerät nicht optimal eingestellt wird, wenn die Fluoreszenzemission nicht korrekt kompensiert wird und wenn die Fenster nicht sorgfältig positioniert werden.
- Die effiziente Durchführung der Lysereaktion muss von Auge geprüft werden. Unvollständig lysierte Erythrozyten erscheinen auf einem Lichtbrechungsdiagramm in der gleichen Position wie Leukozyten.

### QUALITÄTSKONTROLLE

Für eine einwandfreie Auswertung, sollten folgende Parameter berücksichtigt werden:

- Es ist typisch, dass drei **Leukozytenpopulationen**, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten in der FSC/SSC Darstellung zu sehen sind. Ihr Auftreten kann als ein Kriterium für die Qualität der Blutprobe gewertet werden (Zeit seit der Abnahme, Lagerungsbedingungen).
- Negative Kontrolle** (Puffer Kontrolle): Der individuelle Patientenbasiswert von 2.0 bis 2.5 % aktivierten Basophilen sollte als negativ bewertet werden. Dieser Wert wurde auch als Grundlage für die Ermittlung der allergenspezifischen Cut-offs herangezogen.
- Positive Kontrolle** (Stimulation-Kontrolle). Zwei unterschiedliche Positiv Kontrollen sind im Kit enthalten. **Anti-FcεRI** mAk ahmt die vom Allergen verursachte Kreuzvernetzung der an die Rezeptoren gebundenen spez. IgE Moleküle nach. **fMLP** ist ein Tripeptid, das auf einem nicht immunologischen Weg basophile Zellen aktiviert. Zeigt eine dieser beiden Kontrollen eine Basophilenaktivierung von >10% an, kann die Patientenprobe als auswertbar betrachtet werden.
- Non-responder** sind Personen, die eine niedrige Reaktivität zu fMLP und anti-FcεRI Antikörper zeigen (<10% CD63+CD203c positiver Zellen). Eine Auswertung von Blutspender- und Patientendaten ergab, dass 6.0% (n=116) Non-responder auf anti-FcεRI und 2.9% (n=70) auf fMLP waren.

### INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Um eine optimale Sensitivität und Spezifität zur erreichen, sollten für die unterschiedlichen Allergengruppen, leicht angepasste Grenzwerte (Cut-Off) angewendet werden. Basierend auf verschiedene Studien und Evaluationen empfiehlt BÜHLMANN die folgenden Grenzwerte:

Inhalations- Allergene:	≥15%	
Lebensmittel Allergene:	≥15%	
Hymenopteragifte:	≥10%	
Betalaktam Antibiotika*:	≥5%	SI ≥2
Analgetika*:	≥5%	SI ≥2
Lebensmittelzusatzstoffe*	≥5%	SI ≥2

\* Medikamente und andere chemische Allergene ergeben gewöhnlich einen geringeren Aktivierungs-Prozentsatz. Daher sollte ein niedrigerer Grenzwert gewählt werden, wobei zusätzlich ein Stimulations-Index berücksichtigt werden muss (SI = Allergen-Stimulation über negative Kontrolle). Der SI muss ≥ 2 sein, damit das Resultat als positiv interpretiert werden kann.

BÜHLMANN Allergene wurden für die CAST® Assays validiert. Individuelle Cut-offs wurden in Studien oder internen Untersuchungen ermittelt. Weitere Details finden Sie auf den Allergendatenblättern auf der BÜHLMANN Webseite, [www.buhlmannlabs.ch](http://www.buhlmannlabs.ch).

## LEISTUNGSMERKMALE

**Spezifität:** Der anti-CCR3 mAk ist ein hoch spezifischer Antikörper, welcher in Referenz 6 und 7 beschrieben wird. CCR3 wird auf eosinophilen und basophilen Zellen konstitutiv exprimiert (siehe Abbildung 2) sowie in geringerem Ausmass auf CD3+ Zellen (Lymphozyten). Blutproben von acht Normalblutspendern wurden mit anti-CCR3-PE und anti-CD3-AF647 doppelgefärbt. Der relative Anteil an CD3+ Zellen innerhalb der selektierten Basophilenpopulation betrug 3.9% (siehe Tabelle 3).

n	16
Mittelwert	3.85%
95. Perzentile	1.93 – 5.41%

Tabelle 3: Spezifität. Die relative Anzahl (Mittelwert) CD3+ Zellen innerhalb der selektierten Basophilen Population.

**Basophilen Ausbeute:** Nach der Lyse wurden Zellen von 43 Blutspendern in 250 µl Waschpuffer resuspendiert und in einem 100 µl Aliquot dieser Zellsuspension ausgezählt unter Verwendung des Partec PAS Flow Zytometer, das an einen Partec RobbyWell Automaten angeschlossen war. Die mittlere Ausbeute an Basophilen betrug 958 Zellen (95. Perzentile 310 bis 2336 Basophile).

**Präzision:** Ein Präzisionsprofil wurde mit Hilfe verschiedener stimulierter Blutproben (n=20). Jede Probe wurde 12 x mit Stimulationspuffer oder Stimulations-Kontrolle inkubiert und danach im Flowzytometer ausgewertet. Die Ergebnisse sind aufgetragen als Variationskoeffizient (%CV) gegen die % Aktivierung (CD63+CD203c<sup>pos</sup>). Das Präzisionsprofil ist in Abbildung 5 dargestellt. Bei einer Aktivierung oberhalb von 10% ist der CV unterhalb von 15%.

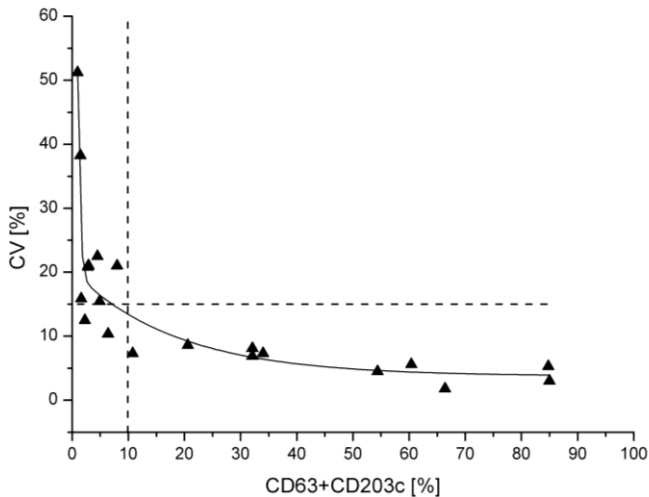


Abb. 5: Präzisionsprofil

**Inter Technician Variation: 6.1 - 11.7 % CV.** Zwei Proben von Normalblutspendern wurden mit dem Flow CAST<sup>®</sup> von sechs Labormitarbeitern in zwei verschiedenen Labors innerhalb des gleichen Tages getestet. Beide in Kit enthaltenen Positivkontrollen, STCON und FMLP, wurden eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

	Probe1 (%CD63+CD203c <sup>pos</sup> )		Probe2 (%CD63+CD203c <sup>pos</sup> )	
	STCON	FMLP	STCON	FMLP
Mean	81.1	58.0	83.5	69.5
SD	5.57	6.80	5.88	4.24
%CV	6.9%	11.7%	7.0%	6.1%

Tabelle 4: Inter Technician Variation

**Normalbereiche** wurden mit normalen Blutspendern im Alter von 18-60 ermittelt. Der Median für anti-FcεRI stimulierte Proben beträgt 71.1% (25. Perzentile: 38.1 %, 75. Perzentile: 85.8%). Der Median für fMLP stimulierte Proben beträgt 45.7 % (25. Perzentile: 30.0 %, 75. Perzentile: 59.7%). Siehe Tabelle 5.

	n	%CD63+CD203c <sup>pos</sup>		
		Median	2.5 – 97.5 Perzentile	25 – 75 Perzentile
STCON	116	71.1	3.4 – 97.9	38.1 – 85.8
fMLP	70	45.7	8.9 – 89.4	30.0 – 59.7

Tabelle 5: Normalbereiche

**Interferenzen:** Es wird empfohlen, dass Patienten systemische, zur Therapie der Allergie eingesetzte Medikamente wie Corticosteroide oder Chromoglycinsäure (DSCG) mindestens 24 Stunden vor der Blutentnahme abzusetzen.

EDTA und die in Tabelle 6 aufgelisteten **Antihistaminika** wurden gemäss den CLSI Richtlinien für Interferenzmessungen EP7-A2 (Ref. 8) getestet. Bis zu den aufgelisteten Konzentrationen wurden keine Interferenzen beobachtet. (Ruf. 9). Hohe **EDTA Konzentrationen** inhibieren die Expression von CD63 und CD203c und können deshalb zu falsch niedrigen Aktivierungswerten führen. Sind die Blutentnahmeröhrchen nicht komplett gefüllt, erhöht sich die Konzentration von EDTA. Ist das Röhrchen zu weniger als 50% gefüllt, tritt eine Inhibition von circa 40% der maximalen Aktivierung auf (siehe Tabelle 7).

Medikament	Inhaltsstoff	Keine Interferenz bis zu	
Telfast <sup>®</sup>	Fexofenadin	1.9	µg/mL
Aerius <sup>®</sup>	Des-Loratadin	4.0	µg/mL
Claritine <sup>®</sup>	Loratadin	0.017	µg/mL
Cetirizin-Teva <sup>®</sup>	Cetirizin	1.5	µg/mL
Xyzal <sup>®</sup>	Levo-Cetirizin	1.4	µg/mL

Tabelle 6: Interferenz von Antihistaminika

Röhrchen Füllung	Vol (mL)	EDTA Konz.(mg/mL)	Wiederfindung
1/1	9	1.8	100%
3/4	6.75	2.4	100%
1/2	4.5	3.6	61%
1/4	2.25	7.2	11%
1/9	1	16.2	9%

Tabelle 7: Interferenz von EDTA durch Simulation eines "short draws"

## DOMAINE D'UTILISATION

Le kit Flow CAST® highsens est un test d'activation des basophiles (TAB) destiné à la détection *in vitro* des réactions allergiques de type immédiat et des hypersensibilités contre des allergènes suspectés.

Le test est conçu pour mesurer les quantités relatives de basophiles CD63 et CD203c positifs par rapport au nombre total de basophiles (CCR3 positifs) dans le sang total par cytométrie de flux, après stimulation par un antigène.

## PRINCIPE DU TEST DE DOSAGE

Le tampon de stimulation et un allergène sont ajoutés à du sang total traité à l'EDTA provenant de patients suspectés allergiques/hypersensibles. L'allergène imite la réaction *in vivo* au cours de laquelle le dit allergène se lie pour pontage aux molécules de surface d'IgE spécifiques. Cette réaction active une cascade de signalisation intracellulaire responsable de l'activation des basophiles. Ainsi, les composés intracellulaires portant la protéine transmembranaire CD63 fusionnent avec la membrane cellulaire, s'exposant ainsi à la matrice extracellulaire. De plus, la teneur en marqueur de surface CD203c est régulée à la hausse.

Un anticorps monoclonal particulièrement spécifique se liant au récepteur de forte affinité pour IgE (FcεRI) et l'activateur cellulaire non spécifique fMLP sont utilisés en tant que contrôles positifs.

Pendant la réaction de stimulation, un réactif de coloration est ajouté. Le réactif de coloration contient un mélange d'anticorps monoclonaux dirigés contre les CD63 et CD203c humains, tous deux marqués par le colorant tandem PE-DY647, ainsi qu'un anticorps monoclonal contre CCR3 (CD193) marqué à la phycoérythrine (PE). *In vivo*, CCR3 est exprimé de façon constitutive par les éosinophiles et les basophiles (réf. 6, 7, 10). Il est donc employé comme marqueur sélectif des cellules basophiles. Les érythrocytes sont éliminés par une réaction de lyse. Après une courte étape de centrifugation, les cellules restantes sont resuspendues dans le tampon de lavage, avant d'être analysées par cytométrie de flux. Consulter FLOW CYTOMETRIC DATA ACQUISITION page 4).

## RÉACTIFS FOURNIS ET PRÉPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
<b>Tampon de stimulation</b> contient du calcium et de l'héparine	1 flacon, lyoph.	B-CCR-CSB	Reconstituer avec 50 ml d'eau <sup>1)</sup>
<b>Contrôle de stimulation</b> anti-FcεRI mAb	2 flacons, lyoph.	B-CCR-STCON	Reconstituer avec 1,5 ml de B-CCR-CSB
<b>Contrôle de stimulation fMLP<sup>2)</sup></b>	2 flacons, lyoph.	B-CCR-FMLP	Reconstituer avec 1,5 ml de B-CCR-CSB
<b>Réactif de coloration</b> Mélange d'anti-CD63-PE-DY647, d'anti-CD203c-PE-DY647 et d'anti-CCR3-PE mAb	1 flacon 4,4 ml	B-HSBAT-SR	Prêt à l'emploi
<b>Réactif de lyse</b> Concentré 10 fois	1 flacon 25 ml	B-CCR-LYR	Diluer dans 225 ml d'eau déionisée <sup>1)</sup>
<b>Tampon de lavage</b>	1 flacon 100 ml	B-CCR-WB	Prêt à l'emploi

Tableau 1

<sup>1)</sup> Pour les exigences sur la qualité de l'eau, consulter le chapitre

« Remarques Techniques ».

<sup>2)</sup> N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine

## STOCKAGE ET DURÉE DE CONSERVATION DES RÉACTIFS

Réactifs non ouverts	
Conserver à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption du kit.	
Réactifs ouverts/reconstitués	
Tampon de stimulation	Stable à -20 °C pendant 6 mois. Conserver sous forme de petites quantités en cas d'utilisation répétée.
Contrôle de stimulation	
Contrôle de stimulation fMLP	
Réactif de lyse	Stable à 2-8 °C pendant 6 mois.
Réactif de coloration	Stable à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption.
Tampon de lavage	

Tableau 2

## ALLERGÈNES REQUIS MAIS NON FOURNIS

Les allergènes validés pour les analyses CAST® sont fournis par BÜHLMANN. Consulter la liste des allergènes sur notre site Internet pour obtenir les références catalogue correspondantes ([www.buhlmannlabs.ch](http://www.buhlmannlabs.ch)).

– **Les allergènes protéiniques** sont livrés sous forme de liquides concentrés (1µl/flacon) et doivent être dilués avant utilisation.

– **Les allergènes de type médicament et produit chimique** sont livrés sous forme lyophilisée et doivent être reconstitués avant utilisation.

Consulter le livret sur les allergènes de BÜHLMANN et les **Fiches de données sur les allergènes** disponibles sur le site Internet [www.buhlmannlabs.ch](http://www.buhlmannlabs.ch).

## ALLERGÈNES D'AUTRES ORIGINES

Les allergènes provenant d'autres sources peuvent éventuellement être utilisés dans le dosage Flow CAST®, avec les restrictions suivantes :

- Pas d'allergènes piégés dans une matrice, en phase solide ou liquide.
- Pas de préparations d'allergène contenant des composés cytotoxiques comme des stabilisants ou des conservateurs, par exemple le glycérol, le phénol, l'azoture de sodium ou le merthiolate (thimérosal).

Pour obtenir une assistance dans la préparation des allergènes non fournis par BÜHLMANN, consultez-nous ou contactez votre distributeur local.

## AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS D'EMPLOI DES RÉACTIFS

**Réactifs contenant des matériels d'origine humaine :**

Le tampon de stimulation (B-CCR-CSB) contient des composants d'origine humaine. Chaque unité de sérum entrant dans la préparation a été testée par une méthode homologuée. Elle est séronégative pour l'antigène de surface du virus de l'hépatite B, pour le virus de l'hépatite C et pour les anticorps anti-VIH1/2. Bien que ces méthodes soient d'une exactitude remarquable, il ne peut être garanti que ce matériel ne transmettra pas d'hépatite ou le SIDA. *En conséquence, tous les échantillons provenant de patients ainsi que les réactifs doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux. Toutes les précautions raisonnables doivent être prises.*

## MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Tubes de ponction veineuse K-EDTA.
- Centrifugeuse 500 x g.
- Tubes à essai jetables en polystyrène sans pyrogène et portoirs de tubes à essai pour la stimulation  
REMARQUE : les tubes en polystyrène doivent être adaptés avec le cytomètre de flux utilisé (par exemple, des tubes FALCON 12 x 75 mm de Becton Dickinson, référence catalogue : 352052).
- Vortex.
- Pipettes de précision à pointe jetable sans pyrogène : Pipettes réglables 10-100 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml et distributeur réglable 40-200 µl.
- Éprouvette de 50 ml pour la préparation du tampon de stimulation.
- Eau stérile, ultrapure et apyrogénique pour la préparation des réactifs de stimulation cellulaire. Consulter le chapitre « Remarques Techniques ».
- Bain-marie à 37 °C.
- Eau distillée ou déionisée et bécher ou éprouvette pour la préparation du réactif de lyse.
- Distributeurs sur flacon pour le réactif de lyse et le tampon de lavage.
- Cytomètre en flux à longueur d'onde d'excitation de 488 nm (bleu) ou 532 nm (vert), conçu pour détecter la diffusion vers l'avant (FSC), la diffusion latérale (SSC) et les deux fluorochromes PE et PE-DY647 (analogues de PC5), y compris le logiciel correspondant. Consulter le chapitre FLOW CYTOMETRIC DATA ACQUISITION.

## PRÉLÈVEMENT ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

Recueillir une quantité suffisante de sang dans les **tubes de ponction veineuse K-EDTA**. Remplir les tubes de ponction veineuse jusqu'au volume indiqué. Dans les tubes remplis à moins de 75 %, la concentration en EDTA de l'échantillon est supérieure, ce qui peut entraîner l'obtention de résultats faux négatifs.

1 ml de sang total suffit pour 9 tests environ.

Effectuer immédiatement la stimulation cellulaire, ou conserver l'échantillon de sang réfrigéré à 2-8 °C pendant 48 heures maximum. Pour détecter les réponses aux médicaments, limiter cette durée à 24 heures après prélèvement des échantillons sanguins. **Ne pas centrifuger ni congeler les échantillons sanguins.**

## REMARQUES TECHNIQUES

- QUALITÉ D'EAU RECOMMANDÉE POUR LE TEST FLOW CAST® highsens. Il est essentiel de reconstituer le tampon de stimulation (B-CCR-CSB) avec de l'eau stérile, ultrapure et apyrogénique pour obtenir une stimulation des basophiles suffisante et reproductible. Les eaux suivantes peuvent être employées : eau de qualité culture cellulaire, eau de qualité perfusion ou eau déionisée et doublement distillée, filtrée sur ultrafiltre 10 kDa régulièrement désinfecté.

Le réactif de lyse (B-CCR-LYR) doit être reconstitué dans de l'eau déionisée et doublement distillée ou dans une eau de qualité équivalente à celle utilisée pour reconstituer les réactifs de stimulation cellulaire.

- MESURES DE PREVENTION DE LA CONTAMINATION PAR LES ALLERGENES PENDANT LA STIMULATION CELLULAIRE. Les aéro-allergènes du laboratoire peuvent contaminer les suspensions cellulaires et les échantillons sanguins ouverts provenant des patients. Ce phénomène est susceptible de causer une élévation du « background » des échantillons. Il faut donc veiller à bien fermer les

échantillons sanguins et les tubes de stimulation cellulaire. La présence d'acariens, 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. Nous recommandons de mettre en oeuvre les étapes de préparation et de stimulation cellulaire sous une hotte à flux laminaire.

## PROCÉDURE DE DOSAGE

17. Mélanger l'échantillon sanguin contenant l'anticoagulant en retournant plusieurs fois le tube de ponction veineuse.
18. Préparer des tubes de polystyrène neufs et sans pyrogène de 3,5 ml, adaptés aux mesures de cytométrie en flux.
19. Étiqueter les tubes pour chaque patient.  
BF = « background »  
PC1 = contrôle de stimulation par anti-FcεRI Ab  
PC2 = contrôle de stimulation par fMLP  
A1-1 : allergène 1 à la dilution 1  
A1-2 : allergène 1 à la dilution 2  
etc.

## Stimulation et coloration

20. Pipetter 100 µl des « stimulateurs » suivants dans chaque tube.  
Tube BF : 100 µl de **tampon de stimulation (bruit de fond)**  
Tube PC1 : 100 µl de **contrôle de stimulation**  
Tube PC2 : 100 µl de **contrôle de stimulation fMLP**  
Tube Ax-y : 100 µl d'**allergène**

Répéter la séquence pour chaque patient.

21. Ajouter 200 µl de tampon de stimulation dans chaque tube.
22. Ajouter 100 µl de sang total de patient à chaque tube. Vérifier qu'il n'y a pas de sang sur les parois latérales et le sommet du tube.
23. Mélanger lentement.
24. Ajouter 40 µl de réactif de coloration dans chaque tube.
25. Mélanger lentement mais complètement. Reboucher les tubes. Incuber pendant 15 minutes à 37 °C au **bain-marie**.  
Dans un incubateur, l'incubation durerait environ 10 minutes de plus du fait de l'efficacité inférieure du transfert thermique.

## Lyse

26. Ajouter 2 ml de réactif de lyse, équilibré à 18-28 °C, dans chaque tube. Mélanger lentement.
27. Incuber pendant 5 à 10 minutes à 18-28 °C.
28. Centrifuger les tubes pendant 5 minutes à 500 x g.
29. Décanter le surnageant à l'aide de papier absorbant.
30. Suspendre à nouveau le culot cellulaire dans 200 µl de tampon de lavage.

**Remarque :** en fonction du cytomètre en flux, il peut être nécessaire d'augmenter le volume de tampon de lavage, par exemple jusqu'à 800 µl.

31. Vortexer légèrement.
32. Acquérir les données de cytométrie de flux le même jour. Si les échantillons sont conservés plusieurs heures

(mais moins de 16 heures) avant analyse, les tenir à l'abri de la lumière à 2-8 °C.

## ACQUISITION DES DONNÉES DE CYTOMÉTRIE EN FLUX

L'acquisition par cytométrie de flux peut être effectuée sur tout cytomètre de flux équipé d'une diode laser à argon à 488 nm (lumière d'excitation bleue) ou d'une diode laser verte à 532 nm.

Le cytomètre en flux doit être équipé pour détecter la diffusion vers l'avant (FSC), la diffusion latérale (SSC) et les deux fluorochromes PE et PE-DY647 (analogues de PC5).

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

Pendant l'acquisition des données des échantillons, la population des leucocytes doit être séparée en trois groupes distincts sur l'histogramme de FSC/SSC. Ajuster l'amplification, c'est-à-dire le gain, des signaux FSC et SSC pour obtenir une distribution cellulaire semblable à celle illustrée sur la Figure 1. Consulter le manuel du cytomètre en flux pour plus d'informations.

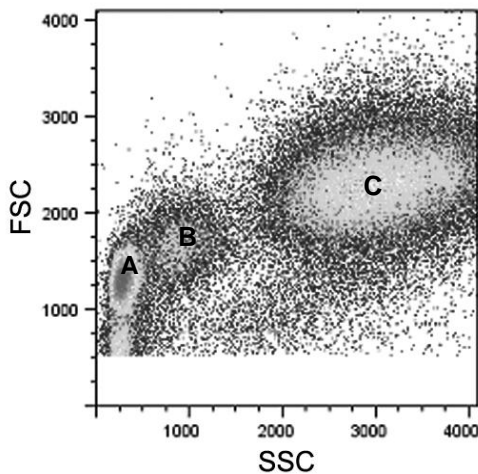


Figure 1 : trois groupes de population distincts – lymphocytes (A), monocytes (B) et granulocytes (C) – sur l'histogramme FSC/SSC.

L'acquisition peut généralement être arrêtée après 800 à 1000 cellules basophiles (traitées par un filtre logiciel comme illustré sur la figure 2). Pour obtenir des résultats fiables, il convient d'analyser au moins 300 cellules basophiles, ce qui implique l'acquisition d'une quantité totale de 100 000 à 200 000 leucocytes par échantillon.

L'analyse des allergies aux médicaments est plus difficile. Chez ces patients, l'activation des basophiles est plus faible que chez les patients souffrant d'autres allergies, par exemple aux allergènes des pollens. Paramétrer à 800 le nombre minimum de cellules basophiles à analyser. Nous recommandons à chaque laboratoire de définir ses propres limites de confiance.

## ANALYSE DES DONNÉES

Tous les logiciels d'analyse de cytométrie en flux, comme FlowJo, FloMax ou CellQuest, sont capables d'analyser les données acquises.

L'analyse s'effectue en deux étapes :

1. Inclure la population totale de basophiles CCR3<sup>pos</sup> en réglant le filtre logiciel R1 sur la diffusion latérale inférieure SSC<sup>low</sup>. Les éosinophiles situés en position supérieure droite SSC<sup>high</sup> sont exclus. Voir la Figure 2.
2. Affichage des cellules sélectionnées par R1 sur un graphique, avec en abscisse CCR-PE et en ordonnée

CD63 + CD203c-PE-DY647. Configurer un filtre par quadrant de sorte que la proportion de cellules dans le quadrant supérieur droit, correspondant au bruit de fond de l'activation (tube BF), soit comprise entre 2,0 et 2,5 % du nombre total de cellules basophiles filtrées par R1. Voir la Figure 3.

**Remarque :** configurer un nouveau seuil de quadrant à chaque nouveau patient. Une fois le quadrant défini par la mesure du bruit de fond du patient (BF), utiliser les mêmes paramètres de quadrant pour l'analyse des autres tests à effectuer sur les échantillons provenant de ce patient (contrôles positifs et allergènes). Voir la Figure 4.

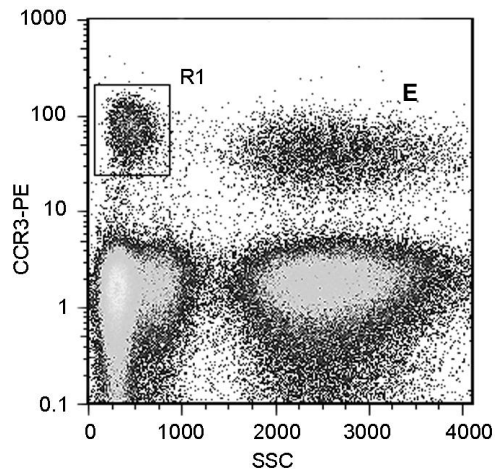
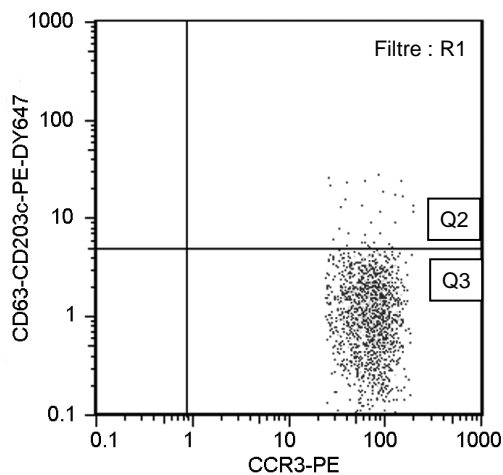
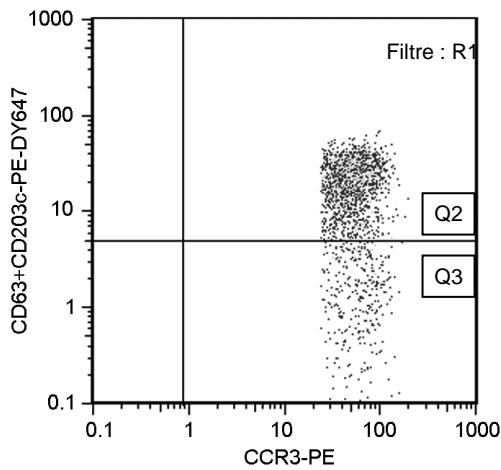


Figure 2 : sélection des cellules basophiles (R1) CCR3<sup>pos</sup> / SSC<sup>low</sup>



Région filtrée	Numération (n =)	%
Total	152483	
R1	1560	100.0
Q2 (CD63 + CD203c <sup>pos</sup> )	33	2.1
Q3 (CD63 + CD203c <sup>neg</sup> )	1527	97.9

Figure 3 : bruit de fond du patient (BF) avec CSB uniquement



Région filtrée	Numération (n =)	%
Total	156543	
R1	1504	100.0
Q2 (CD63 + CD203c <sup>pos</sup> )	1221	81.2
Q3 (CD63 + CD203c <sup>neg</sup> )	283	18.8

Figure 4 : contrôle de stimulation (STCON)

### LIMITES

- Pour éviter des résultats erronés avec la cytométrie de flux, aligner correctement le cytomètre, régler correctement la compensation de l'émission de fluorescence et positionner soigneusement les régions filtrées.
- Vérifier à l'oeil nu les préparations pour évaluer l'efficacité de la lyse. La lyse des érythrocytes peut être incomplète : dans ce cas, les érythrocytes apparaissent au même endroit que les lymphocytes sur l'histogramme de diffraction de la lumière.

### CONTRÔLE DE QUALITÉ

Pour évaluer correctement les résultats, il convient de prendre en compte plusieurs valeurs :

- En général, trois **populations de leucocytes** distinctes, les lymphocytes, les monocytes et les granulocytes, apparaissent sur le graphique de FSC/SSC. Leur présence peut être considérée comme un critère de qualité de l'échantillon sanguin (date et durée de collecte, conservation).
- Contrôle négatif** (contrôle par tampon) : la valeur de bruit de fond d'un patient est considérée comme négative lorsqu'elle est comprise entre 2,0 et 2,5 % de celle des basophiles activés. Cette valeur sert également de base à la détermination des seuils de coupure spécifiques aux allergènes.
- Contrôle positif** (contrôle de stimulation). Le kit contient deux contrôles positifs différents. **Anti-FcεRI mAb** réplique le pontage *in vivo* du récepteur provoqué par l'allergène. **fMLP** est un tripeptide provoquant une activation non immunologique des basophiles. Si l'un de ces deux agents de stimulation provoque une activation de **plus de 10 %** des basophiles, l'échantillon est évaluable.
- Les patients non répondeurs** présentent une réactivité faible (moins de 10 % de cellules CD63 + CD203c positives) à fMLP et aux anticorps anti-FcεRI. L'analyse des résultats provenant de patients et de donneurs de sang normaux démontre que 6,0 % (pour n = 116) des personnes étudiées sont des non

répondeurs à anti-FcεRI, et que 2,9 % (pour n = 70) sont des non répondeurs à fMLP.

### INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Pour obtenir une sensibilité et une spécificité optimales, il convient d'appliquer des valeurs de cut off légèrement différentes aux différents groupes d'allergènes. Sur la base de nombreuses études et évaluations, BÜHLMANN recommande les valeurs de seuil de coupure suivantes :

Aéroallergènes :	≥15 %	
Allergènes alimentaires :	≥15 %	
Venins d'hyménoptères :	≥10 %	
Bêta-lactames* :	≥5 %	IS ≥ 2
Analgésiques* :	≥5 %	IS ≥ 2
Additifs alimentaires*	≥5 %	IS ≥ 2

\* Les médicaments, comme les autres allergènes chimiques, présentent généralement des pourcentages d'activation plus faibles que les autres allergènes. Il convient donc d'adopter un cut off plus bas. Cependant, l'indice de stimulation IS (stimulation de l'allergène divisée par le contrôle négatif) doit être supérieur ou égal à 2 pour que le résultat puisse être considéré comme positif.

Les allergènes de BÜHLMANN sont validés. Chaque cut off est établi par des études ou des évaluations internes. Pour plus de détails, consulter la fiche de données de chaque allergène sur notre site Internet, [www.buhlmannlabs.ch](http://www.buhlmannlabs.ch).

### PERFORMANCES DU DOSAGE

**Spécificité** : l'anti-CCR3 mAb est un anticorps à forte spécificité (réf. 6 et 7). CCR3 est exprimé de façon constitutive par les leucocytes éosinophiles et basophiles (voir Fig. 2), et dans une moindre mesure par les cellules CD3 + (lymphocytes). Des échantillons de huit donneurs de sang normaux ont été soumis deux fois à une double coloration par anti-CCR3-PE et anti-CD3-AF647. La proportion relative moyenne de cellules CD3 + dans la population de basophiles filtrée par le logiciel est de 3,9 %. Consulter le Table 3.

n	16
Moyenne	3,85 %
95 <sup>e</sup> percentile	1,93 – 5,41 %

Tableau 3 : spécificité – proportion relative moyenne de cellules CD3 + dans la population de basophiles filtrée.

**Rendement en basophiles** : Après l'étape de lyse, des cellules de 43 donneurs de sang normaux sont resuspendues dans 250 µl de tampon de lavage et dénombrées dans un prélèvement de 100 µl de cette suspension cellulaire sur un cytomètre en flux Partec PAS relié à un automate Partec RobbyWell. Le rendement moyen en basophiles est de 958 cellules (95<sup>e</sup> percentile, 310 à 2336 basophiles).

**Précision** : un profil de précision est calculé à partir d'échantillons sanguins stimulés de diverses façons (n = 20). Chaque échantillon est incubé 12 fois avec le tampon de stimulation ou le contrôle de stimulation, avant d'être analysé par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés sous forme du coefficient de variation (%CV) et tracés en fonction du pourcentage d'activation (CD63 + CD203c<sup>pos</sup>). Le profil de précision est illustré par la Figure 5. Pour une activation des basophiles supérieure à 10 %, le CV est inférieur à 15 %.

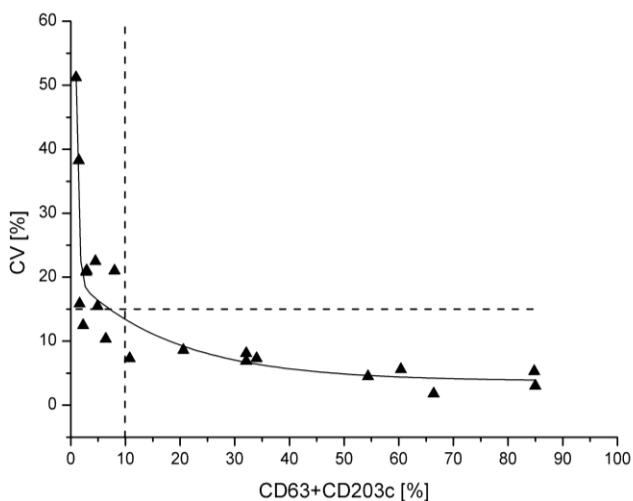


Figure 5: profil de précision

**Variation inter-manipulateurs : CV 6,1 à 11,7 %.** Deux échantillons sanguins de donneurs de sang asymptomatiques sont testés par six manipulateurs différents dans deux laboratoires différents, dans la même journée. Les deux contrôles positifs inclus dans le kit, STCON et FMLP, sont utilisés. Les résultats sont consignés dans le Table 4.

	Échantillon 1 (% CD63 + CD203c <sup>pos</sup> )		Échantillon 2 (% CD63 + CD203c <sup>pos</sup> )	
	STCON	FMLP	STCON	FMLP
Moyenne	81,1	58,0	83,5	69,5
Écart-Type	5,57	6,80	5,88	4,24
<b>CV en %</b>	<b>6,9 %</b>	<b>11,7 %</b>	<b>7,0 %</b>	<b>6,1 %</b>

Tableau 4 : variation inter-manipulateurs

**Les intervalles de référence** sont établis pour des donneurs de sang normaux âgés de 18 à 60 ans. La valeur médiane correspondant aux échantillons stimulés par anti-FcεRI est de 71,1 % (25<sup>e</sup> percentile : 38,1 %, 75<sup>e</sup> : 85,8 %). La valeur médiane correspondant aux échantillons stimulés par fMLP est de 45,7 % (25<sup>e</sup> percentile : 30,0 %, 75<sup>e</sup> : 59,7 %). Consulter le Table 5.

	n	% CD63 + CD203c <sup>pos</sup>		
		Médiane	2,5 <sup>e</sup> – 97,5 <sup>e</sup> percentiles	25 <sup>e</sup> – 75 <sup>e</sup> percentiles
STCON	116	71.1	3.4 – 97.9	38.1 – 85.8
fMLP	70	45.7	8.9 – 89.4	30.0 – 59.7

Tableau 5 : intervalles de référence

**Interférences :** il est recommandé aux patients d'éviter les médicaments antiallergiques systémiques comme les corticoïdes ou l'acide chromoglycique (DSCG) au moins 24 heures avant le prélèvement de l'échantillon sanguin. L'EDTA et les **antihistaminiques** répertoriés dans le Table 6 ont été évalués conformément au protocole CLSI homologué pour les tests d'interférences EP7-A2 (réf. 8). Aucune interférence n'a été observée pour les antihistaminiques jusqu'aux concentrations indiquées (réf. 9). À concentration élevée, l'**EDTA** inhibe l'expression de CD63 et de CD203c, ce qui peut conduire à des valeurs d'activation inférieures. Une concentration supérieure en EDTA survient lorsque les tubes de prélèvement sanguin par ponction veineuse ne sont pas entièrement remplis. Un

remplissage inférieur à 50 % entraîne une inhibition d'environ 40 % de l'activation maximale possible. Consulter le Table 7.

Médicament	Principe actif	Pas d'interférence jusqu'à
Telfast®	Fexofénadine	1,9 µg/mL
Aerius®	Des-Loratadine	4,0 µg/mL
Claritine®	Loratadine	0,017 µg/mL
Cetirizin-Teva®	Cétirizine	1,5 µg/mL
Xyzal®	Lévo-Cétirizine	1,4 µg/mL

Tableau 6 : Interférence des antihistaminiques

Niveau de remplissage du tube	vol (mL)	Conc. EDTA (mg/mL)	Récupération
1/1	9	1.8	<b>100%</b>
3/4	6.75	2.4	<b>100%</b>
1/2	4.5	3.6	<b>61%</b>
1/4	2.25	7.2	<b>11%</b>
1/9	1	16.2	<b>9%</b>

Tableau 7 : Interférence de la stimulation par l'EDTA en cas de prélèvement insuffisant

## USO PREVISTO

Il kit **Flow CAST® highsens** è un test di attivazione dei basofili (BAT) indicato per la determinazione *in vitro* delle reazioni allergiche di tipo immediato e delle ipersensibilità nei confronti di allergeni sospetti.

Il test è stato progettato per determinare la quantità relativa di basofili positivi CD63 e CD203c dal numero totale di basofili (CCR3 positivi) nel sangue intero mediante citometria a flusso in seguito a stimolazione con antigene.

## PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il Tampone di stimolazione e l'allergene vengono addizionati a campioni di sangue intero in EDTA prelevati ai pazienti con sospetta allergia/ipersensibilità. L'allergene mima la reazione *in vivo*, dove le IgE specifiche legate alla superficie cellulare sono legate dall'allergene responsabile. Questo attiva una cascata di attivazione del segnale intracellulare che induce l'attivazione della cellula basofila. Come conseguenza, le componenti intracellulari, in cui è localizzata la proteina transmembrana CD63, si fondono con la membrana cellulare e vengono quindi esposte alla matrice extracellulare. Inoltre il marcatore superficiale CD203c viene sovraregolato.

Come controlli positivi, il test usa un anticorpo monoclonale altamente specifico per il recettore ad alta affinità per le IgE (FcεRI) oppure dell'attivatore cellulare aspecifico fMLP.

Nella fase di stimolazione cellulare si aggiunge il Reagente di colorazione, contenente una miscela di anticorpi monoclonali diretti contro le molecole CD63 e CD203c umane, entrambi marcati con il colorante tandem PE-DY647, e un anticorpo monoclonale contro il recettore umano per le chemochine CCR3 (CD193), marcato con ficoeritrina (PE). *In vivo*, CCR3 è espresso costitutivamente su eosinofili e basofili (6,7,10) e viene pertanto utilizzato come marcatore di selezione per cellule basofile.

Gli eritrociti vengono rimossi tramite reazione di lisi e, dopo una breve centrifugazione, le cellule vengono risospese nel Tampone di lavaggio e analizzate mediante citometria a flusso (*cf.* ACQUISIZIONE DATI TRAMITE CITOMETRIA A FLUSSO a pag. 4).

## REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Tampone di stimolazione contenente calcio ed eparina	1 flaconcino o liof.	B-CCR-CSB	Ricostituire con 50 ml di acqua 1)
Controllo di stimolazione anti-FcεRI mAb	2 flaconcini liof.	B-CCR-STCON	Ricostituire con 1,5 ml di B-CCR-CSB
Controllo di stimolazione fMLP	2 flaconcini liof.	B-CCR-FMLP	Ricostituire con 1,5ml di B-CCR-CSB
Reagente di colorazione Miscela di mAb anti-CD63-PE-DY647, anti-CD203c-PE-DY647 e anti-CCR3-PE	1 flaconcino 4,4 ml	B-HSBAT-SR	Pronto per l'uso
Reagente di lisi Concentrato 10x	1 flaconcino 25 ml	B-CCR-LYR	Diluire con 225 ml di acqua deionizzata <sup>1)</sup>
Tampone di lavaggio	1 flaconcino 100 ml	B-CCR-WB	Pronto per l'uso

Tabella 8

<sup>1)</sup> Per la qualità necessaria dell'acqua, si rimanda al paragrafo Note procedurali

<sup>2)</sup> N- formil-metionil-leucil-fenilalanina

## CONSERVAZIONE E VALIDITÀ DEI REAGENTI

Reagenti chiusi	
Conservare a 2 - 8 °C. Non usare dopo la data di scadenza del kit.	
Reagenti aperti / ricostituiti	
Tampone di stimolazione	Stabile a -20 °C per 6 mesi. Per l'uso ripetuto, aliquotare il reagente.
Controllo di stimolazione	
Controllo di stimolazione fMLP	
Reagente di lisi	Stabile a 2-8 °C per 6 mesi.
Reagente di colorazione	Stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza.
Tampone di lavaggio	

Tabella 9

## ALLERGENI NECESSARI MA NON FORNITI

Gli allergeni validati per l'analisi nei test CAST® sono forniti da BÜHLMANN. Codici di ordinazione: si rimanda all'elenco degli Allergeni BÜHLMANN sul sito web ([www.buhmannlabs.ch](http://www.buhmannlabs.ch)).

– Gli **allergeni proteici** BÜHLMANN sono di qualità controllata e vengono forniti in forma liquida concentrata (1 µl/flaconcino) e devono essere diluiti prima dell'uso.

– Gli **allergeni farmacologici e chimici** sono forniti in forma liofilizzata e devono essere ricostituiti prima dell'uso.

Si rimanda in proposito all'opuscolo Allergeni BÜHLMANN e ai **Fogli illustrativi degli allergeni** disponibili sul sito web BÜHLMANN ([www.buhmannlabs.ch](http://www.buhmannlabs.ch)).

## ALLERGENI DI ALTRA PROVENIENZA

Gli allergeni di altra provenienza possono essere usati con il test Flow CAST® con le seguenti limitazioni:

- Nessun allergene legato a una matrice (fase solida o liquida).

- Nessuna preparazione allergenica contenente sostanze citotossiche (stabilizzanti, conservanti) come glicerolo, fenolo, sodio azide o mertiolato (thimerosal).

Per la procedura d'uso di allergeni di altra provenienza nei test CAST®, rivolgersi al distributore locale o direttamente a BÜHLMANN.

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

## Reagenti contenenti materiale umano:

Il Tampone di stimolazione (B-CCR-CSB) contiene componenti di origine umana. Ogni siero utilizzato nella preparazione è stato testato con un metodo approvato ed è risultato negativo per l'antigene di superficie dell'HBV e per gli anticorpi anti-HCV e anti-HIV 1 e 2. Benché questi metodi siano molto precisi, non esistono garanzie che questo materiale non possa trasmettere l'Epatite o l'AIDS. *Pertanto occorre trattare tutti i campioni dei pazienti e i componenti del kit come potenzialmente infettivi e adottare misure precauzionali idonee.*

## MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Provette K-EDTA per venipuntura.
- Centrifuga per centrifugazioni a 500 x g.

- Provette di analisi monouso apirogene in polistirene e porta provette idonei per la stimolazione  
NOTA: Le provette in polistirene devono essere compatibili con il citometro a flusso utilizzato (ad es. provette FALCON 12 x 75 mm Becton Dickinson; codice: 352052). 352052).
- Miscelatore vortex.
- Pipette di precisione con puntali monouso apirogeni: Pipette regolabili 10-100 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml e un dispensatore regolabile 40-200 µl.
- Cilindro graduato (50 ml) per la preparazione del Tampone di stimolazione.
- Acqua sterile, ultrapura e apirogena per la preparazione dei reagenti di stimolazione cellulare (cfr. paragrafo Note procedurali).
- Bagnomaria impostato a 37 °C.
- Acqua distillata o deionizzata e un becher o cilindro graduato per la preparazione del Reagente di lisi.
- Dispensatori per flacone per il Reagente di lisi e il Tampone di lavaggio.
- Citometro a flusso con lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm (blu) o 532 nm (verde), in grado di determinare la rifrazione lineare (Forward Scatter, FSC) e la rifrazione laterale (Side Scatter, SSC) e di rilevare i due fluorocromi PE e PE-DY647 (analogo a PC5), incluso l'opportuno software (cfr. paragrafo ACQUISIZIONE DATI MEDIANTE CITOMETRIA A FLUSSO).

#### RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Raccogliere una quantità sufficiente di sangue in provette **K-EDTA per venipuntura**. Riempire di sangue le provette per venipuntura fino al volume previsto. Nelle provette non riempite sufficientemente (grado di riempimento <75%) aumenta la concentrazione di EDTA nel campione che può generare risultati falsamente negativi.

1 ml di sangue intero è sufficiente per circa 9 provette di analisi.

Effettuare immediatamente la stimolazione cellulare o conservare il campione in frigorifero (2-8 °C) fino a 48 ore. Per la rilevazione delle risposte ai farmaci conservare il campione di sangue solo fino a 24 ore dal prelievo. **Non centrifugare o congelare i campioni ematici.**

#### NOTE PROCEDURALI

- **QUALITÀ RACCOMANDATA DELL'ACQUA PER IL TEST FLOW CAST® highsens.** L'uso di acqua sterile, ultrapura e apirogena per la ricostituzione del Tampone di stimolazione (B-CCR-STB) è essenziale per una ottimale e riproducibile stimolazione basofila. Possono essere utilizzati i seguenti tipi di acqua: acqua per colture cellulari, acqua per preparazioni iniettabili o deionizzata, acqua bidistillata e ultrafiltrata con ultrafiltro da 10 kDa sottoposto a periodica manutenzione.

Il Reagente di lisi (B-CCR-LYR) deve essere ricostituito con acqua deionizzata, bidistillata o acqua della stessa qualità usata per i reagenti di stimolazione cellulare.

- **PRECAUZIONI PER EVITARE LA CONTAMINAZIONE ALLERGENICA DURANTE LA STIMOLAZIONE CELLULARE** Gli aeroallergeni presenti nel laboratorio possono contaminare i campioni ematici aperti e le sospensioni cellulari dei pazienti, con potenziale rischio di background elevato. Pertanto, occorre prestare attenzione a coprire i campioni ematici e le provette per stimolazione cellulare. Occorre evitare la presenza di acari della polvere, piante che rilasciano pollini, guanti in lattice o materiali potenzialmente contenenti lattice e l'apertura di finestre nel laboratorio nel quale si effettua la stimolazione cellulare. Per tali ragioni, si

raccomanda di effettuare le fasi di preparazione e stimolazione cellulare in una cappa a flusso laminare.

#### PROCEDURA DI DOSAGGIO

- Mescolare il campione ematico contenente l'anticoagulante capovolgendo diverse volte la provetta per venipuntura.
- Preparare una serie di provette pulite e apirogene in polistirene da 3,5 ml, adatte per misurazioni con citometro a flusso.
- Per ciascun paziente, contrassegnare le provette come segue, *ad es.* :  
PB = background paziente  
PC1 = controllo di stimolazione con anti-FcεRI Ab  
PC2 = controllo di stimolazione con fMLP  
A1-1 per l'allergene 1 con diluizione 1  
A1-2 per l'allergene 1 con diluizione 2  
ecc.

#### Stimolazione e colorazione

- Pipettare 100 µl dei seguenti stimoli in ciascuna provetta  
Provetta PB:  
100 µl di **Tampone di Stimolazione (background)**  
Provetta PC1: 100 µl di **Controllo di Stimolazione**  
Provetta PC2: 100 µl di **Controllo di Stimolazione fMLP**  
Provetta Ax-y: 100 µl di **Allergene**

Ripetere la sequenza per ciascun paziente.

- Aggiungere 200 µl di tampone di Stimolazione a ciascuna provetta.
- Aggiungere 100 µl di sangue intero del paziente a ciascuna provetta. Assicurarsi che la parete laterale e la parte superiore della provetta siano prive di sangue.
- Mescolare con delicatezza.
- Aggiungere 40 µl di reagente di colorazione a ciascuna provetta.
- Mescolare delicatamente ma accuratamente, coprire le provette e incubare per 15 minuti a 37 °C a **bagnomaria**.

(in incubatore è necessario un tempo di incubazione più lungo di 10 minuti a causa del trasferimento di calore meno efficiente).

#### Lisi

- Aggiungere a ciascuna provetta 2 ml di Reagente di lisi regolato a 18-28 °C e mescolare con delicatezza.
- Incubare per 5-10 minuti a 18-28 °C.
- Centrifugare le provette per 5 minuti a 500 x g.
- Decantare il sovrantante su carta da filtro.
- Risospingere il pellet cellulare con 200 µl di Tampone di lavaggio.

**Nota:** A seconda del citometro a flusso, può essere necessaria una quantità maggiore di Tampone di lavaggio (ad es. 800 µl).

- Mescolare con delicatezza sul vortex.
- Acquisire i dati con il citometro a flusso il giorno stesso. Se i campioni vengono conservati per diverse ore prima dell'analisi (<16 h), devono essere conservati al riparo dalla luce a 2-8 °C.

## ACQUISIZIONE DATI TRAMITE CITOMETRIA A FLUSSO

L'acquisizione tramite citometria a flusso può essere effettuata con un citometro a flusso che utilizzi un diodo laser argon a 488 nm (luce di eccitazione blu-verde) o un diodo laser a luce verde a 532 nm.

Il citometro a flusso deve essere in grado di determinare la rifrazione lineare (Forward Scatter, FSC) e la rifrazione laterale (Side Scatter, SSC) e di rilevare i due fluorocromi FITC e PE-DY647 (analogo a PC5).

Verificare che il citometro a flusso sia allineato a livello ottimale e che sia adeguatamente impostata la compensazione del colore.

Durante l'acquisizione dei campioni, assicurarsi che nell'istogramma FSC/SSC la popolazione leucocitaria sia suddivisa in tre popolazioni distinte. Regolare l'amplificazione (gain) dei segnali FSC e SSC per ottenere la distribuzione riportata in Figura 1. Per le relative istruzioni si rimanda al manuale del citometro a flusso.

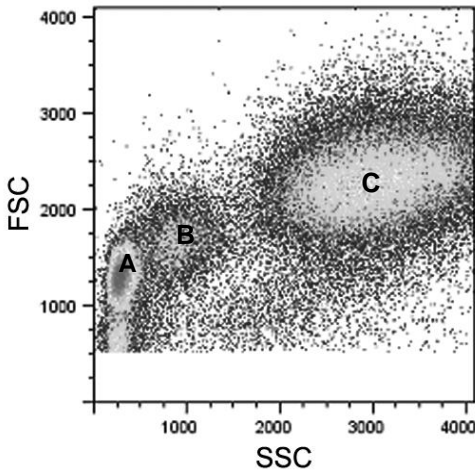


Figura 1: Tre popolazioni discrete per linfociti (A), monociti (B) e granulociti (C) nell'istogramma FSC/SSC.

Generalmente l'acquisizione può essere interrotta dopo 800-1000 cellule basofile (comprese nel gate definito come in Figura 2),. Per ottenere risultati attendibili, devono essere analizzate almeno 300 cellule basofile, corrispondenti all'acquisizione di un totale di 100.000-200.000 leucociti per campione.

L'analisi delle allergie ai farmaci è più difficile, perché l'attivazione dei basofili in questi pazienti è inferiore rispetto ai pazienti che soffrono di altre allergie (ad es. al polline). Pertanto occorre impostare il limite inferiore delle cellule basofile a 800.

Ciascun laboratorio deve definire i propri limiti di confidenza.

## ANALISI DEI DATI

L'analisi dei dati acquisiti può essere effettuata con un qualsiasi software analitico per citometria a flusso, ad es. FlowJo, FloMax, CellQuest o altri.

L'analisi comprende due fasi:

- Includere l'intera popolazione basofila  $CCR3^{pos}$  impostando il gate 1 (R1) con Side Scatter basso  $SSC^{low}$ . Gli eosinofili situati nella parte superiore, in posizione  $SSC^{high}$  (lato superiore destro) saranno esclusi (vedere Figura 2).
- Visualizzare le cellule selezionate in R1 in un grafico con CCR-PE sull'asse delle X e CD63 +CD203c-PE-DY647 sull'asse delle Y. Impostare un gate a quadranti

in modo che il rapporto delle cellule nel quadrante superiore destro per l'attivazione di base (provetta PB) sia compreso tra il 2,0% e 2,5% del numero totale di cellule basofile incluse nel gate in R1 (vedere Figura 3).

**Nota:** Impostare una nuova soglia di quadrante per ciascun paziente. Una volta definito il quadrante mediante misurazione del background del paziente (PB), utilizzare lo stesso quadrante per l'analisi degli altri test da effettuare con il rispettivo campione del paziente (controlli positivi e allergeni. Vedere Figura 4).

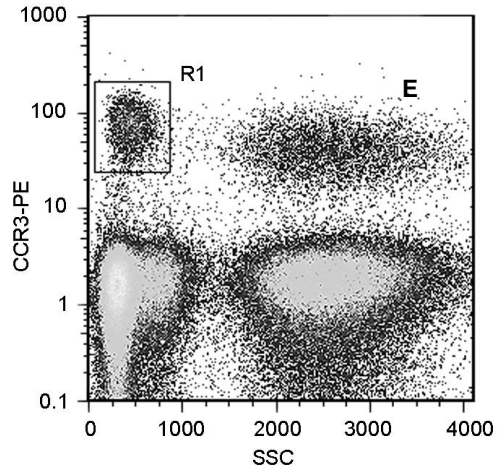
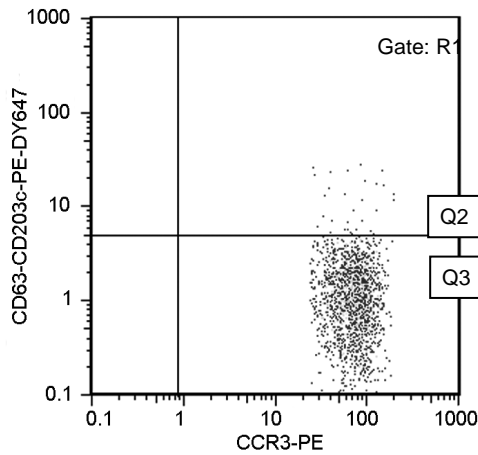
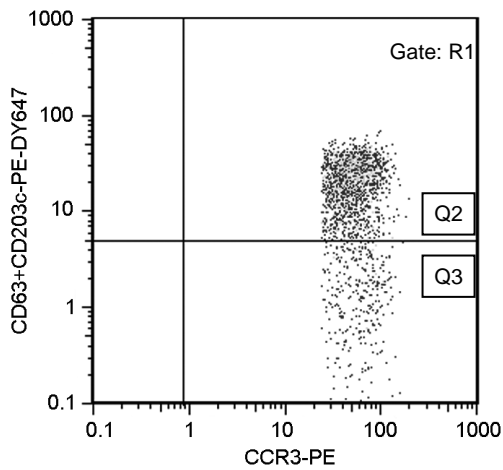


Figura 2: Selezione di cellule basofile (R1)  $CCR3^{pos} / SSC^{low}$



Regione 'gated'	Conteggio (n=)	%
Totale	152483	
R1	1560	100,0
Q2 (CD63+CD203c <sup>pos</sup> )	33	2,1
Q3 (CD63+CD203c <sup>neg</sup> )	1527	97,9

Figura 3: Background paziente (PB) con solo CSB



Regione 'gated'	Conteggio (n=)	%
Totale	156543	
R1	1504	100,0
Q2 (CD63+CD203c <sup>pos</sup> )	1221	<b>81,2</b>
Q3 (CD63+CD203c <sup>pos</sup> )	283	18,8

Figura 4: Controllo di stimolazione (STCON)

### LIMITAZIONI

- La citometria a flusso può produrre risultati falsi se il citometro a flusso non è stato allineato a livello ottimale, se l'emissione di fluorescenza non è stata correttamente compensata e se le regioni non sono state posizionate con cura.
- Controllare visivamente i preparati per verificare l'efficacia della lisi. Gli eritrociti possono subire una lisi incompleta e comparire in un istogramma a diffrazione di luce nella stessa posizione dei leucociti.

### CONTROLLO DI QUALITÀ

Per l'interpretazione corretta dei risultati occorre tenere in considerazione diversi aspetti:

- Tipicamente, nel grafico FSC/SSC appaiono tre distinte popolazioni di leucociti: linfociti, monociti e granulociti. La loro presenza può essere considerata un criterio per discriminare la qualità del campione di sangue (tempo trascorso dal prelievo, conservazione).
- Il **numero assoluto di basofili** recuperati e valutati indica se il test è stato eseguito in modo adeguato e se è stato acquisito un numero di basofili statisticamente significativo per rilevare le differenze con il campione di controllo. Nella nostra esperienza il numero di basofili che dovrebbe essere analizzato è di almeno 300 cellule. Per ottenere una riproducibilità dei risultati ottimale il **numero di basofili attivati (CD63+CD203c<sup>pos</sup>)** da analizzare dovrebbe essere sopra le 50 cellule (CVs < 15%).
- Controllo negativo** (controllo tampone): Un valore di base per il singolo paziente di 2,0 - 2,5 % di basofili attivati deve essere considerato negativo. Questa è stata anche la base per la determinazione dei cut-offs per gli allergeni specifici.
- Controllo positivo** (controllo di stimolazione). Il kit comprende due diversi controlli positivi. Il **mAb Anti-FcεRI** mima il legame crociato del recettore in vivo indotto dall'allergene. L'**fMLP** è un tripeptide che induce un'attivazione basofila tramite un meccanismo non immunologico. Il campione è considerato valutabile se in almeno uno dei due controlli positivi si riscontra l'attivazione di un numero di basofili >10%.

- I "**non-responder**" sono individui con bassa reattività (<10% di cellule positive CD63+CD203c) all'fMLP e all'anticorpo anti-FcεRI. La valutazione di dati da donatori di sangue e pazienti sani ha dimostrato la presenza di un 6,0% (per n=116) di non-responder rispetto all'anti-FcεRI e di un 2,9% (per n=70) di non-responder all'fMLP.

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Per ottenere una sensibilità e una specificità ottimali, è opportuno stabilire cut-offs leggermente differenti per i diversi gruppi di allergeni. In base a numerosi studi e analisi, BÜHLMANN raccomanda l'uso dei seguenti cut-offs:

Allergeni da inalazione:	≥15%	
Allergeni alimentari:	≥15%	
Veleni di imenotteri:	≥10%	
Betalattamici*:	≥5%	SI ≥2
Analgesici*:	≥5%	SI ≥2
Additivi alimentari*:	≥5%	SI ≥2

- \* I farmaci e altri allergeni chimici inducono generalmente percentuali di attivazione minori di altri allergeni. Pertanto è opportuno stabilire un valore di cut-off inferiore, ma l'indice di stimolazione (SI = stimolazione allergenica diviso per controllo negativo) deve essere uguale o superiore a 2 perché il risultato possa essere considerato positivo. Gli allergeni BÜHLMANN sono stati validati. Sono stati stabiliti singoli valori di cut-off in studi o valutazioni interne. Per dettagli si rimanda ai Fogli illustrativi degli allergeni sul sito Web di BÜHLMANN, [www.buhmannlabs.ch](http://www.buhmannlabs.ch).

### CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

**Specificità:** Il mAb anti-CCR3 è un anticorpo altamente specifico (6 e 7). Il CCR3 è costitutivamente espresso sui leucociti eosinofili e basofili (vedere Fig. 2) e su una piccola frazione di cellule CD3+ (linfociti). I campioni prelevati a otto donatori di sangue sani sono stati doppiamente colorati con anti-CCR3-PE e anti-CD3-AF647 per due volte. La quantità relativa (media) di cellule CD3+ nella popolazione basofila selezionata è stata del 3,9% (cfr. Tabella 3).

n	16
Media	3,85%
95° percentile	1,93 – 5,41%

Tabella 10: Specificità. La quantità relativa (media) di cellule CD3+ nella popolazione basofila selezionata.

**Resa di basofili:** Dopo la lisi, cellule prelevate da 43 donatori di sangue sani sono state risospese in 250 µl di Tampone di lavaggio e conteggiate da un'aliquota di 100 µl di questa sospensione di cellule utilizzando un citometro a flusso Partec PAS collegato a un sistema Partec RobbyWell automatizzato. La resa media di basofili è stata di 958 cellule (95° percentile: 310 - 2336 basofili).

**Precisione:** È stato calcolato un profilo di precisione a partire da campioni ematici stimolati in modo differente (n=20). Ciascun campione è stato incubato 12 volte con Tampone di stimolazione o Controllo di stimolazione e analizzato consecutivamente mediante citometria a flusso. I risultati sono espressi come coefficiente di variazione (CV %) e riportati in un grafico in funzione della % di attivazione

(CD63+CD203c<sup>POS</sup>). Il profilo di precisione è mostrato in Figura 5. A un'attivazione basofila superiore al 10% il CV è inferiore al 15%.

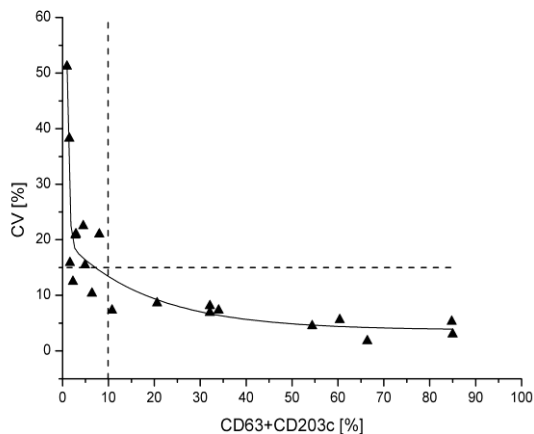


Figura 5: Profilo di precisione

**Variazione intertecnica: CV 6,1 - 11,7%.** Due campioni ematici di donatori di sangue asintomatici sono stati analizzati lo stesso giorno da parte di sei tecnici di laboratorio differenti in due diversi laboratori. Sono stati utilizzati entrambi i controlli positivi inclusi nel kit, STCON e FMLP. I risultati sono espressi in Tabella 4.

	Campione1 (%CD63+CD203c <sup>POS</sup> )		Campione2 (%CD63+CD203c <sup>POS</sup> )	
	STCON	FMLP	STCON	FMLP
Media	81,1	58,0	83,5	69,5
DS	5,57	6,80	5,88	4,24
<b>CV (%)</b>	<b>6,9%</b>	<b>11,7%</b>	<b>7,0%</b>	<b>6,1%</b>

Tabella 11: Variazione intertecnica

Gli **intervalli di riferimento** sono stati stabiliti con donatori di sangue sani (Età 18-60). Il valore mediano per campioni con stimolazione anti-FcεRI è risultato pari al 71,1% (percentile 25° : 38,1 %, 75°: 85,8%). Il valore mediano per campioni con stimolazione fMLP è risultato pari al 45,7% (percentile 25°: 30,0 %, 75°: 59,7%). Vedere Tabella 5.

	n	%CD63+CD203c <sup>POS</sup>		
		Mediano	2,5° - 97,5° percentile	25° - 75° percentile
STCON	116	71,1	3,4 - 97,9	38,1 - 85,8
fMLP	70	45,7	8,9 - 89,4	30,0 - 59,7

Tabella 12: Intervalli di riferimento

**Interferenze:** È consigliabile che i pazienti evitino la somministrazione sistemica di farmaci antiallergici quali corticosteroidi e acido cromoglicico (DSCG) per almeno 24 ore prima della raccolta dei campioni ematici.

L'EDTA e i **farmaci antistaminici** elencati in Tabella 6 sono stati valutati secondo le linee guida CLSI approvate per la valutazione delle interferenze, EP7-A2 (Rif. 8). Non è stata osservata alcuna interferenza per gli antistaminici fino alle concentrazioni riportate (Rif. 9). Un'elevata concentrazione di **EDTA** inibisce l'espressione di CD63 e

CD203c, per cui può produrre valori di attivazione inferiori. Il riempimento incompleto di provette per la raccolta di sangue per venipuntura provoca un aumento della concentrazione di EDTA. Un grado di riempimento inferiore al 50% porta all'inibizione del 40% circa della massima attivazione possibile. Vedere Tabella 7.

Farmaco	Componente attivo	Nessuna interferenza fino a	
Telfast®	Fexofenadin	1,9	µg/ml
Aerius®	Des-Loratadin	4,0	µg/ml
Claritine®	Loratadin	0,017	µg/ml
Cetirizin-Teva®	Cetirizin	1,5	µg/ml
Xyzal®	Levo-Cetirizin	1,4	µg/ml

Tabella 13: Interferenza di farmaci antistaminici

Livello di riempimento della provetta	vol (ml)	Conc. EDTA (mg/ml)	Recupero
/1	9	1.8	<b>100%</b>
3/4	6.75	2.4	<b>100%</b>
1/2	4.5	3.6	<b>61%</b>
1/4	2.25	7.2	<b>11%</b>
1/9	1	16.2	<b>9%</b>

Tabella 14: Interferenza di simulazione EDTA di un "prelievo scarso"

**USO PREVISTO**

El kit **Flow CAST® highsens** es una prueba de activación de basófilos (BAT) prevista para uso en la detección *in vitro* de hipersensibilidades y reacciones alérgicas inmediatas frente a alérgenos sospechados.

La prueba ha sido diseñada para determinar la cantidad relativa de basófilos positivos para CD63 y CD203c de entre el número total de basófilos (positivos para CCR3) presentes en sangre entera mediante citometría de flujo tras estimulación antigénica.

**PRINCIPIO DEL ENSAYO**

Se añaden alérgeno y tampón de estimulación a sangre entera con EDTA de pacientes que se sospecha son alérgicos / hipersensibles. El alérgeno emula la reacción *in vivo* por la que determinadas moléculas de IgE unidas a la superficie celular resultan enlazadas mediante puentes del alérgeno en cuestión. Eso activa una cascada de señalización intracelular conducente a la activación de los basófilos. Como consecuencia, los compuestos intracelulares portadores de la proteína transmembrana CD63 se fusionan con la membrana celular resultando así expuestos a la matriz extracelular. Además, se produce una regulación al alza del marcador superficial CD203c.

Se utilizan como controles positivos un anticuerpo monoclonal con unión altamente específica al receptor de IgE de alta afinidad (FcεRI) o el activador celular inespecífico fMLP.

Durante la reacción de estimulación, se añade reactivo de tinción. El reactivo de tinción contiene una mezcla de anticuerpos monoclonales frente a CD63 y CD203c humanos, ambos etiquetados con el tinte en tándem PE-DY647, y un anticuerpo monoclonal frente a CCR3 (CD193) etiquetado con ficoeritrina (PE). *In vivo*, CCR3 se expresa de manera constitutiva en eosinófilos y basófilos (Refs. 6,7,10), razón por la que se utiliza como marcador de selección para células basófilas.

Se retiran los eritrocitos mediante una reacción de lisado y, tras un breve paso de centrifugación, se resuspenden las células restantes en tampón de lavado y se analizan mediante citometría de flujo (véase ADQUISICIÓN DE DATOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO en la página 24).

**REACTIVOS SUMINISTRADOS Y PREPARACIÓN**

Reactivos	Cant.	Código	Reconstitución
<b>Tampón de estimulación</b> contiene calcio y heparina	1 vial liof.	<b>B-CCR-CSB</b>	Reconstituir con 50 ml de agua <sup>1)</sup>
<b>Control de estimulación</b> anticuerpo monoclonal anti-FcεRI	2 viales liof.	<b>B-CCR-STCON</b>	Reconstituir con 1,5 ml de B-CCR- CSB
<b>Control de estimulación fMLP<sup>2)</sup></b>	2 viales liof.	<b>B-CCR-FMLP</b>	Reconstituir con 1,5 ml de B-CCR-CSB
<b>Reactivo de tinción</b> mezcla de anticuerpos monoclonales anti-CD63-PE-DY647, anti-CD203c-PE-DY647 y anti-CCR3-PE	1 vial 4,4 ml	<b>B-HSBAT-SR</b>	Listo para su uso
<b>Reactivo de lisado</b> concentrado 10x	1 vial 25 ml	<b>B-CCR-LYR</b>	Diluir con 225 ml de agua desionizada <sup>1)</sup>
<b>Tampón de lavado</b>	1 vial 100 ml	<b>B-CCR-WB</b>	Listo para su uso

Tabla 1

<sup>1)</sup> En relación con la calidad del agua requerida, véase el capítulo Notas de procedimiento

<sup>2)</sup> N- formil-metionil-leucil-fenilalanina

**ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL DE LOS REACTIVOS**

Reactivos sin abrir	
Almacenar a 2-8 °C. No utilizar pasada la fecha de caducidad del kit.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Tampón de estimulación	Estables a –20 °C durante 6 meses. Almacenar en alícuotas si se espera un uso repetido.
Control de estimulación	
Control de estimulación fMLP	
Reactivo de lisado	Estable a 2-8 °C durante 6 meses.
Reactivo de tinción	Estables a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad.
Tampón de lavado	

Tabla 2

**ALERGENOS REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS**

BÜHLMANN ofrece alérgenos validados para análisis en ensayos CAST®. Consulte la lista de alérgenos que aparece en la página web ([www.buhmannlabs.ch](http://www.buhmannlabs.ch)) para obtener los respectivos códigos de pedido.

– Los **alérgenos proteicos** se envían en forma de líquidos concentrados (1 □l/vial) y deben ser diluidos antes de su uso.

– Los **alérgenos farmacológicos y químicos** se envían liofilizados y deben ser reconstituidos antes de su uso. Consulte el folleto sobre alérgenos y las **fichas de datos de alérgenos** de BÜHLMANN disponibles en el sitio web [www.buhmannlabs.ch](http://www.buhmannlabs.ch).

**ALERGENOS DE OTRAS FUENTES**

Los alérgenos procedentes de otras fuentes se pueden utilizar en el ensayo Flow CAST® con las limitaciones siguientes:

- No se pueden utilizar alérgenos unidos a una matriz (fase sólida o líquida).
- No se pueden utilizar preparaciones de alérgenos que contengan compuestos (estabilizantes, conservantes) citotóxicos tales como glicerol, fenol, azida sódica o mertiolato (timerosal).

Si necesita asistencia con la preparación de alérgenos no suministrados por BÜHLMANN, póngase en contacto con nosotros o consulte a su distribuidor local.

**ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

**Reactivos que contienen material de origen humano:**

El tampón de estimulación (B-CCR-CSB) contiene componentes de origen humano. Cada suero utilizado en la preparación ha sido ensayado mediante métodos aprobados y ha dado negativo para anticuerpos frente a VIH 1/2 y VHC así como antígeno de superficie de VHB. Si bien esos métodos son muy rigurosos, no hay garantía de que este material no pueda transmitir la hepatitis o el SIDA. *Por lo tanto, todas las muestras de pacientes y los componentes del kit se deben manipular como si pudieran transmitir infecciones, tomándose todas las precauciones razonables.*

**MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS**

- Tubos con K-EDTA para venopunción.
- Centrifuga a 500 x g.
- Tubos de ensayo desechables de poliestireno sin pirógenos, y gradillas para tubos de ensayo apropiadas

para la estimulación.

NOTA: Los tubos de poliestireno deben ser aptos para el citómetro de flujo utilizado (p.ej. tubos FALCON de 12 x 75 mm de Becton Dickinson; código para pedidos: 352052).

- Mezclador vorticial.
- Pipetas de precisión con puntas sin pirógenos desechables:  
10-100 µl, 100-1000 µl, pipeta ajustable a 1-5 ml y dispensador ajustable a 40-200 µl.
- Cilindro (50 ml) para la preparación del tampón de estimulación.
- Agua estéril, ultrapura y sin pirógenos para la preparación de los reactivos de estimulación celular (véase el capítulo Notas de procedimiento).
- Baño de agua a 37 °C.
- Agua destilada o desionizada junto con un vaso de laboratorio o un cilindro para la preparación del reactivo de lisado.
- Dispensadores de botella para reactivo de lisado y tampón de lavado respectivamente.
- Instrumento citómetro de flujo con una longitud de onda de excitación de 488 nm (azul) o 532 nm (verde), equipado para detectar la dispersión frontal (FSC), la dispersión lateral (SSC) y los dos fluorocromos PE y PE-DY647 (análogo a PC5), incluido software apropiado (véase el capítulo ADQUISICIÓN DE DATOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO).

### EXTRACCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Extraiga una cantidad de sangre suficiente en **tubos con K-EDTA para venopunción**. Llene los tubos para venopunción hasta el volumen especificado. En tubos llenados por debajo del 75%, la concentración de EDTA de la muestra es mayor y se pueden obtener así resultados falsos negativos.

1 ml de sangre entera es suficiente para unas 9 pruebas.

Realice la estimulación celular de inmediato o almacene la muestra de sangre refrigerada (2-8 °C) durante hasta 48 horas. Para poder detectar respuestas frente a fármacos, utilice las muestras de sangre solamente durante las 24 horas siguientes a su extracción. **No centrifugue ni congele las muestras de sangre.**

### NOTAS DE PROCEDIMIENTO

#### • CALIDAD DEL AGUA RECOMENDADA PARA USO CON

FLOW CAST® highsens. Para obtener una estimulación adecuada y reproducible de los basófilos, resulta esencial el uso de agua estéril, ultrapura y sin pirógenos para reconstituir el tampón de estimulación (B-CCR-CSB). Se pueden utilizar las fuentes de agua siguientes: agua de calidad para cultivos celulares, agua de calidad para infusión o agua desionizada y doblemente destilada que ha sido filtrada en un ultrafiltrador a 10 kDa sometido a limpiezas periódicas.

El reactivo de lisado (B-CCR-LYR) debe ser reconstituido con agua desionizada y doblemente destilada o agua de la misma calidad utilizada para los reactivos de estimulación celular.

- PRECAUCIONES PARA EVITAR LA CONTAMINACIÓN CON ALERGENOS DURANTE LA ESTIMULACIÓN CELULAR. Los aeroalergenos presentes en el laboratorio pueden contaminar las muestras de sangre y suspensiones celulares de pacientes abiertas, pudiendo

ocasionar una liberación basal elevada. Por lo tanto, se debe tomar la precaución de cubrir las muestras de sangre y los tubos de estimulación celular. Se debe evitar la presencia de ácaros del polvo, plantas polinizantes, guantes de látex o equipos que puedan contener látex, así como ventanas abiertas en el laboratorio donde se lleva a cabo la estimulación celular. Por lo tanto, recomendamos llevar a cabo los pasos de preparación y estimulación celular en una campana de flujo laminar.

### PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

33. Mezcle la muestra de sangre anticoagulada invirtiendo varias veces el tubo de venopunción.
34. Prepare tubos de poliestireno de 3,5 ml, nuevos y sin pirógenos, aptos para mediciones de citometría de flujo.
35. Etiquete los tubos correspondientes a cada paciente, p.ej.:  
PB = basal del paciente  
PC1 = control de estimulación con anticuerpo anti-FcεRI  
PC2 = control de estimulación con fMLP  
A1-1 para el alérgeno 1 con dilución 1  
A1-2 para el alérgeno 1 con dilución 2  
etc.

#### Estimulación y tinción

36. Pipetee 100 µl de los "estimuladores" siguientes en cada tubo:  
Tubo PB: 100 µl de **tampón de estimulación (basal)**  
Tubo PC1: 100 µl de **control de estimulación**  
Tubo PC2: 100 µl de **control de estimulación fMLP**  
Tubo Ax-y: 100 µl de **alérgeno**

Repita la secuencia para cada paciente.

37. Añada 200 µl de tampón de estimulación a cada tubo.
38. Añada 100 µl de sangre entera del paciente a cada tubo. Asegúrese de que no haya sangre en la pared lateral y el borde superior del tubo.
39. Mezcle suavemente.
40. Añada 40 µl de reactivo de tinción a cada tubo.
41. Mezcle suave pero completamente, cubra los tubos e incúbelos durante 15 minutos a 37 °C en un **baño de agua**.  
(Utilizando un incubador, el tiempo de incubación necesario será de unos 10 minutos más debido a la menor eficiencia de transferencia de calor).

#### Lisado

42. Añada 2 ml de reactivo de lisado, ajustado a 18-28 °C, a cada tubo y mezcle suavemente.
43. Incúbelos durante 5-10 minutos a 18-28 °C.
44. Centrifugue los tubos durante 5 minutos a 500 x g.
45. Decante el sobrenadante utilizando papel secante.
46. Resuspenda el pellet celular con 200 µl de tampón de lavado.

**Nota:** Dependiendo de la instrumentación de citometría de flujo, puede ser necesario utilizar un mayor volumen de tampón de lavado (p.ej. 800 µl).

47. Somete los tubos a vórtex suavemente.
48. Adquiera los datos en el citómetro de flujo dentro del mismo día. Si las muestras se almacenan varias horas antes de llevar a cabo el análisis (<16 h), deben mantenerse protegidas de la luz a 2-8 °C.

## ADQUISICIÓN DE DATOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

La adquisición de datos de citometría de flujo puede llevarse a cabo en cualquier citómetro de flujo que trabaje con un diodo láser de argón a 488 nm (luz de excitación azul) o un diodo láser verde a 532 nm.

El citómetro de flujo debe estar equipado con detección de dispersión frontal (FSC), dispersión lateral (SSC) y canales de detección adecuados para los fluorocromos PE y PE-DY647 (análogo a PC5).

Asegúrese de que el citómetro de flujo esté correctamente alineado y se haya configurado la compensación de color.

Durante la adquisición de datos de las muestras, asegúrese de que la población de leucocitos esté separada en tres poblaciones diferenciadas en el histograma FSC/SSC. Ajuste la amplificación (ganancia) de las señales FSC y SSC para obtener una distribución celular como la mostrada en la Figure 1. Consulte el manual del citómetro de flujo para obtener información adicional.

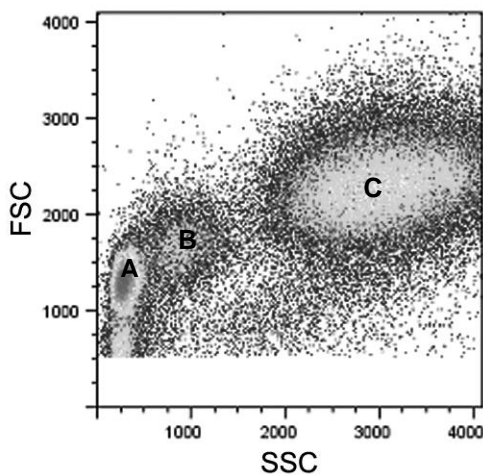


Figura 1: Tres poblaciones diferenciadas correspondientes a linfocitos (A), monocitos (B) y granulocitos (C) en el histograma FSC/SSC.

Generalmente, la adquisición se puede detener tras alcanzar las 800-1000 células basófilas (seleccionadas tal como se muestra en la Figura 2). Para obtener resultados fiables es preciso analizar como mínimo 300 células basófilas. Eso requiere la adquisición de una cantidad total de 100.000-200.000 leucocitos por muestra.

El análisis de alergias a fármacos es más difícil, ya que la activación de los basófilos en esos pacientes es inferior a la que se da en pacientes que sufren otras alergias (p.ej. a alérgenos del polen). Así pues, el límite inferior de células basófilas a analizar debe fijarse en 800. Recomendamos que cada laboratorio defina sus propios límites de confianza.

## ANÁLISIS DE LOS DATOS

El análisis de los datos adquiridos puede realizarse con cualquier software de análisis de datos de citometría de flujo, tal como FlowJo, FloMax, CellQuest u otros.

El análisis se realiza en dos pasos:

1. Incluya toda la población de basófilos CCR3<sup>pos</sup> configurando la ventana de selección R1 con la dispersión lateral baja SSC<sup>baja</sup>. De ese modo se excluirán los eosinófilos situados en posición SSC<sup>alta</sup> (lado superior derecho) (véase la Figure 2).
2. Represente las células seleccionadas en R1 en un gráfico con CCR-PE en el eje X y CD63 +CD203c-PE-DY647 en el eje Y. Establezca un cuadrante en la ventana de selección de manera que la proporción de células dentro del cuadrante superior derecho

correspondiente a la activación basal (tubo PB) se sitúe entre el 2,0 y el 2,5% del número total de células basófilas seleccionadas en R1 (véase la

Figure 3).

**Nota:** Establezca un nuevo umbral de cuadrante para cada paciente. Una vez definido el cuadrante midiendo el tubo basal del paciente (PB), utilice esos mismos parámetros de cuadrante para el análisis de las demás pruebas a realizar con la muestra de ese paciente (controles positivos y alérgenos; (véase la Figure 4).

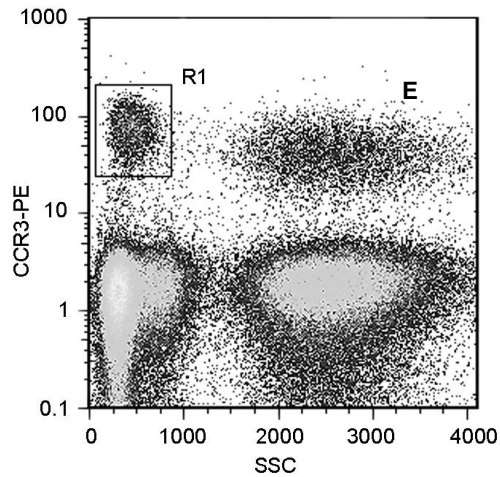
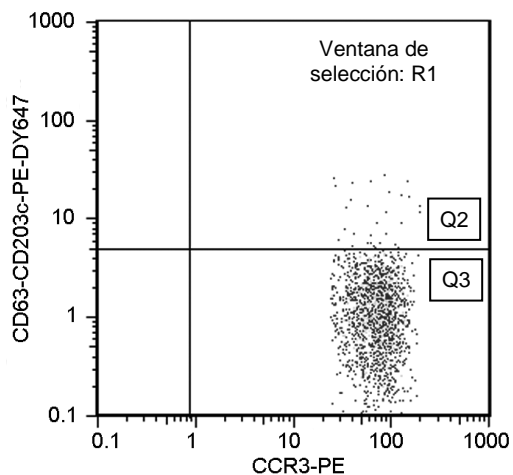
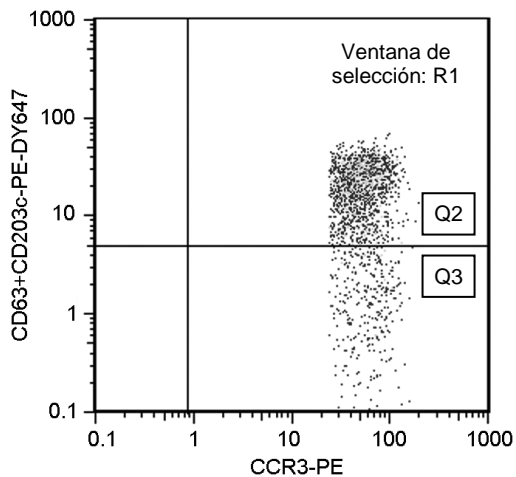


Figura 2: Selección de células basófilas (R1) CCR3<sup>pos</sup> / SSC<sup>baja</sup>



Región seleccionada	Recuento (n=)	%
Total	152483	
R1	1560	100,0
Q2 (CD63+CD203c <sup>pos</sup> )	33	2,1
Q3 (CD63+CD203c <sup>neg</sup> )	1527	97,9

Figura 3: Basal del paciente (PB) con CSB únicamente



Región seleccionada	Recuento (n=)	%
Total	156543	
R1	1504	100,0
Q2 (CD63+CD203c <sup>pos</sup> )	1221	81,2
Q3 (CD63+CD203c <sup>neg</sup> )	283	18,8

Figura 4: Control de estimulación (STCON)

### LIMITACIÓN

- La citometría de flujo puede producir resultados falsos si no se ha alineado correctamente el citómetro, si no se ha compensado correctamente la emisión de fluorescencia o si no se han situado con cuidado las ventanas de selección para cubrir las regiones correctas.
- Compruebe visualmente las preparaciones para valorar la eficacia del lisado. Es posible que los eritrocitos no hayan sido completamente lisados y aparezcan en un histograma de difracción de luz en la misma ubicación que los linfocitos.

### CONTROL DE CALIDAD

Para una evaluación correcta de los resultados, deben tenerse en cuenta distintos valores:

- Generalmente, en el trazado FSC/SSC aparecen tres **poblaciones de leucocitos** diferenciadas correspondientes a linfocitos, monocitos y granulocitos. Su presencia puede considerarse un criterio de calidad de la muestra de sangre (tiempo desde la extracción, almacenamiento).
- Control negativo** (control de tampón): Un valor base para un determinado paciente de entre el 2,0 y el 2,5% de los basófilos activados debe considerarse negativo. Esa es también la base para la determinación de los cortes correspondientes a alérgenos concretos.
- Control positivo** (control de estimulación): En el kit se incluyen dos controles positivos diferentes. El **anticuerpo monoclonal Anti-Fc $\gamma$ RI** emula el puenteo del receptor *in vivo* ocasionado por el alérgeno. **fMLP** es un tripéptido que produce la activación de los basófilos de manera no inmunológica. Si alguno de esos dos estimuladores muestra una activación de **>10%** de los basófilos, la muestra es evaluable.
- Se considera **sin respuesta** a las personas con baja reactividad (<10% de células positivas para CD63+CD203c) frente a fMLP y anticuerpo anti-Fc $\gamma$ RI. La evaluación de datos de donantes de sangre normales y pacientes mostró que un 6,0% (de n=116) eran personas sin respuesta frente a anti-Fc $\gamma$ RI y un 2,9% (de n=70) frente a fMLP.

### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para obtener una sensibilidad y una especificidad óptimas, deben aplicarse valores de corte ligeramente diferentes para distintos grupos de alérgenos. En base a numerosos estudios y evaluaciones, BÜHLMANN recomienda utilizar los valores de corte siguientes:

Alergenos inhalados:	$\geq 15\%$	
Alergenos alimentarios:	$\geq 15\%$	
Venenos de himenópteros:	$\geq 10\%$	
Betalactamas*:	$\geq 5\%$	IE $\geq 2$
Analgésicos*:	$\geq 5\%$	IE $\geq 2$
Aditivos alimentarios*	$\geq 5\%$	IE $\geq 2$

\* Los fármacos y otros alérgenos químicos suelen dar lugar a menores porcentajes de activación que otros alérgenos. Por lo tanto, se debe utilizar un valor de corte más bajo, pero el índice de estimulación (IE = la estimulación del alérgeno dividida por la del control negativo) debe ser igual o superior a 2 para considerar el resultado positivo.

Los alérgenos de BÜHLMANN han sido validados. Se han establecido valores de corte individuales, bien en estudios o en evaluaciones internas. Para obtener más detalles, consulte la ficha de datos del alérgeno correspondiente que encontrará en el sitio web de BÜHLMANN: [www.buhmannlabs.ch](http://www.buhmannlabs.ch). RENDIMIENTO DEL ENSAYO

**Especificidad:** El monoclonal anti-CCR3 es un anticuerpo altamente específico (Refs. 6 y 7). CCR3 se expresa de manera constitutiva en leucocitos eosinófilos y basófilos (véase la Fig. 2) y en menor medida en células CD3<sup>+</sup> (linfocitos). Se sometieron dos veces a tinción doble con anti-CCR3-PE y anti-CD3-AF647 muestras procedentes de ocho donantes de sangre normales. La cantidad relativa (media) de células CD3<sup>+</sup> en la población de basófilos seleccionada fue del 3,9% (véase la Table 3).

n	16
Media	3,85%
Percentil 95	1,93 – 5,41%

Tabla 3: Especificidad. La cantidad relativa (media) de células CD3<sup>+</sup> en la población de basófilos seleccionada.

**Rendimiento en basófilos:** Tras el paso de lisado, las células procedentes de 43 donantes de sangre normales se resuspendieron en 250  $\mu$ l de tampón de lavado, sometiéndose una alícuota de 100  $\mu$ l de esa suspensión celular a recuento utilizando un citómetro de flujo Partec PAS conectado a un automatizador Partec RobbyWell. El rendimiento medio en basófilos fue de 958 células (percentil 95 entre 310 y 2336 basófilos).

**Precisión:** Se calculó un perfil de precisión a partir de muestras de sangre con distinta estimulación (n=20). Cada muestra se incubó 12 veces con tampón de estimulación o control de estimulación y seguidamente se analizó mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como coeficiente de variación (%CV) y se representan frente al porcentaje de activación (CD63+CD203c<sup>pos</sup>). El perfil de precisión se muestra en la Figure 5. Para una activación de basófilos por encima del 10%, el CV está por debajo del 15%.

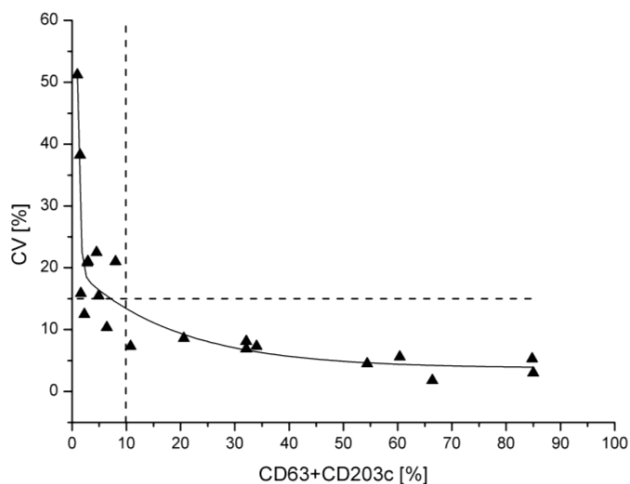


Figura 5: Perfil de precisión

**Variación entre técnicos: 6,1 - 11,7 % CV.** Seis técnicos diferentes sometieron a ensayo dos muestras de sangre de donantes asintomáticos en dos laboratorios diferentes el mismo día. Se utilizaron los dos controles positivos incluidos en el kit: STCON y FMLP. Los resultados se muestran en la Table 4.

	Muestra 1 (%CD63+CD203c <sup>POS</sup> )		Muestra 2 (%CD63+CD203c <sup>POS</sup> )	
	STCON	FMLP	STCON	FMLP
Media	81,1	58,0	83,5	69,5
SD	5,57	6,80	5,88	4,24
<b>%CV</b>	<b>6,9%</b>	<b>11,7%</b>	<b>7,0%</b>	<b>6,1%</b>

Tabla 4: Variación entre técnicos

**Intervalos de referencia.** Se establecieron con muestras procedentes de donantes de sangre normales (con edades entre 18 y 60 años). La mediana para muestras estimuladas con anti-Fc $\gamma$ RI es un 71,1% (percentil 25: 38,1 %; percentil 75: 85,8%). La mediana para muestras estimuladas con FMLP es un 45,7% (percentil 25: 30,0%; percentil 75: 59,7%). Véase la Table 5.

	n	%CD63+CD203c <sup>POS</sup>		
		Mediana	Percentiles 2,5 – 97,5	Percentiles 25 – 75
STCON	116	71,1	3,4 – 97,9	38,1 – 85,8
fMLP	70	45,7	8,9 – 89,4	30,0 – 59,7

Tabla 5: Intervalos de referencia

**Interferencias:** Se recomienda que los pacientes eviten el uso de fármacos antialérgicos administrados por vía sistémica, tales como corticosteroides o ácido cromoglicólico (DSCG) durante al menos las 24 horas previas a la extracción de sangre.

Se evaluaron el EDTA y los **fármacos antihistamínicos** recogidos en la Table 6 conforme a la pauta aprobada por el CLSI para el ensayo de interferencias EP7-A2 (Ref. 8). No se observaron interferencias de los antihistamínicos en concentraciones hasta las recogidas (Ref. 9). Una concentración alta de **EDTA** inhibe la expresión de CD63 y CD203c, pudiendo dar lugar así a valores de activación más bajos. No llenar por completo los tubos de venopunción en los que se extrae la sangre puede dar lugar a concentraciones más altas de EDTA. Llenarlos por debajo del 50% daría lugar a una inhibición de en torno al 40% de la activación máxima posible. Véase la Table 7.

.Fármaco	Componente activo	Sin interferencias hasta	
Telfast <sup>®</sup>	Fexofenadina	1,9	µg/mL
Aerius <sup>®</sup>	Desloratadina	4,0	µg/mL
Claritin <sup>®</sup>	Loratadina	0,017	µg/mL
Cetirizin-Teva <sup>®</sup>	Cetirizina	1,5	µg/mL
Xyzal <sup>®</sup>	Levocetirizina	1,4	µg/mL

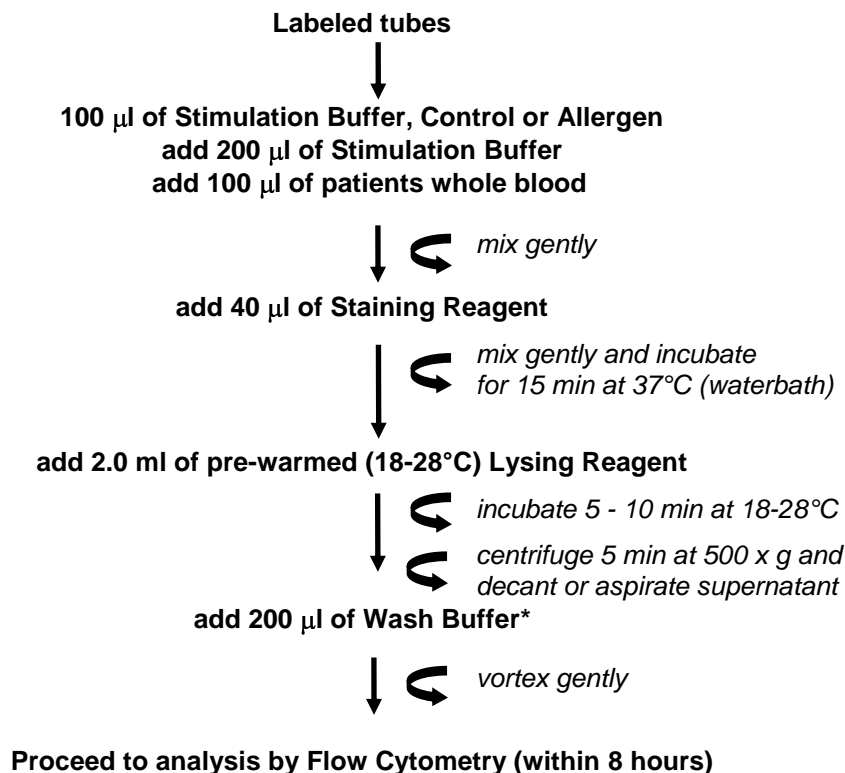
Tabla 6: Interferencia de fármacos antihistamínicos

Nivel de llenado del tubo	vol (mL)	Conc. EDTA (mg/mL)	Recuperación
1/1	9	1,8	<b>100%</b>
3/4	6,75	2,4	<b>100%</b>
1/2	4,5	3,6	<b>61%</b>
1/4	2,25	7,2	<b>11%</b>
1/9	1	16,2	<b>9%</b>

Tabla 7: Simulación de interferencia del EDTA en "extracciones cortas"





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. 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).
4. DeWeck, 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).
5. Gamboa, P et al. The flow-cytometric determination of basophil activation induced aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is useful for in vitro diagnosis of the NSAIDs hypersensitivity syndrome. *Clin Exp Allergy* **34**, 1448-57 (2004)
6. 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)
7. Ducrest, S., F. Meier, et al. (2005). "Flowcytometric analysis of basophil counts in human blood and inaccuracy of hematology analyzers." *Allergy* **60**(11): 1446-50.
8. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): *Interference Testing in Clinical Chemistry*; approved guideline (EP7-A2), 2005.
9. Wolanczyk-Medrala A, et al. (2009). "A new variant of the basophil activation test for allergen-induced basophil CD63 upregulation. The effect of cetirizine." *J Investig Allergol Clin Immunol* **19**(6): 465-73.
10. Hausmann OV., et al. (2010) „Robust expression of CCR3 as a single basophil selection marker in flow cytometry” *Allergy* **66**(1): 85-91

**Flow CAST® highsens**



**TIME TO RESULT: ~ 1 HOUR**

\* **Note:** Depending on Flow cytometry instrumentation it might be necessary to increase the wash buffer volume (e.g. 800 µl).

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
<b>REF</b>	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo N�mero de cat�logo
<b>LOT</b>	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend f�r „n“ Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso
	Temperature limitation Zul�ssiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura

Symbol	Explanation
<b>BUF STIM</b>	Stimulation Buffer Stimmulations-Puffer Tampon de stimulation tampone di stimolazione Tampón de estimulación
<b>CONTROL STIM</b>	Stimulation Control Stimulationskontrolle Contr�le de stimulation Controllo di stimolazione Control de estimulación
<b>CONTROL FMLP</b>	Stimulation Control fMLP Stimulationskontrolle fMLP Contr�le de stimulation fMLP Controllo di stimolazione fMLP Control de estimulación fMLP
<b>REAG STAIN</b>	Staining Reagent F�rbe-Reagenz Réactif de coloration Reagente di colorazione Reactivo de coloración
<b>REAG LYS</b>	Lysing Reagent Lyse Reagenz Réactif de lyse Reagente di lisi Reactivo de l�sis
<b>BUF WASH</b>	Wash Buffer Wasch-Puffer Tampon de lavage tampone di lavaggio Tampón de lavado



Printing Date  
2011-11-09