



Flow2 CAST®

Procedura

FK-CCR

A Commitment to Diagnostics

TF038-03 -I

Pre analitica

- Tipo di Campione: sangue intero EDTA, 1 ml è sufficiente per circa 18 tubi
- Conservazione dei campioni: fino a 48h a 2-8°C (fino a 24h per determinazione di allergia a farmaci) non congelare
- Raccolta dei campioni: il sangue deve essere raccolto prima di test cutanei o provocazioni in vivo
le provette di raccolta EDTA devono essere riempite oltre il 50%
- Pazienti: i pazienti devono interrompere trattamenti con farmaci come antistaminici, corticosteroidi o acidi cromoglicici almeno 24 ore prima del prelievo

Attrezzature necessarie

- Bagno termostato (37°C)
- Citofluorimetro con diodo laser argon 488 nm (luce blu-verde)

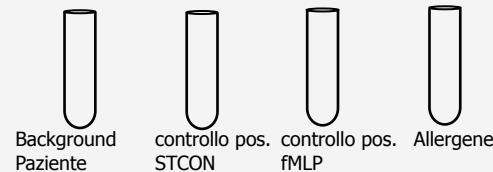
Importante

Allergeni BÜHLMANN

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

Stimolazione/Marcatura e Lisi

Preparare i singoli tubi:- Background paziente
- Controlli positivi (Ab anti-FcεRI ; fMLP)
- Allergeni



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

Aggiungere 100 µl di Stimulation Buffer

Aggiungere 50 µl di sangue intero del paziente (EDTA)

Agitare delicatamente

Aggiungere 20 µl di Staining Reagent

Agitare delicatamente e incubare per 15 minuti a 37°C (bagnomaria)

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

incubare per 5-10 minuti a 18-28°C centrifugare 5 minuti a 500xg e decantare o aspirare il surnatante

Aggiungere 300 µl di Wash Buffer *

Vortex delicatamente

Acquisire i dati al Citofluorimetro

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

Tempo totale del dosaggio: ~60 minuti

Acquisizione dati

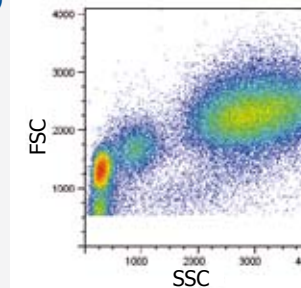


Figura 1: Tre popolazioni; linfociti, monociti e granulociti nell' istogramma FSC/SSC.

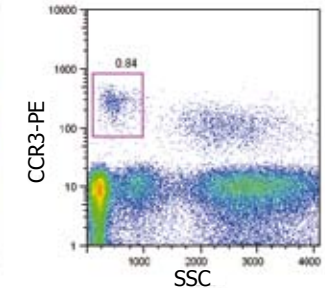
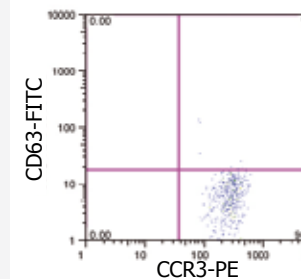
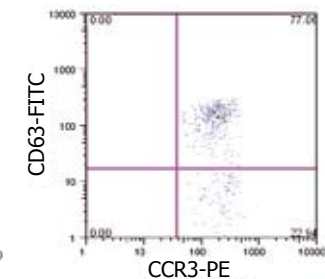


Figura 2: Selezione dei basofili CCR3^{pos} / SSC^{low}



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

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



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

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





Flow2 CAST®

Caratteristiche

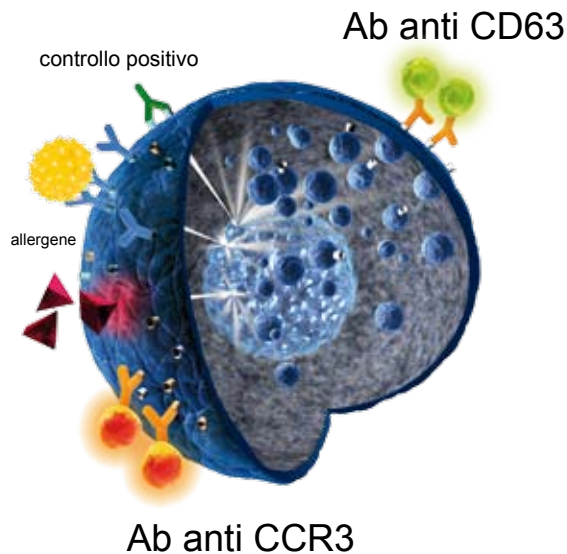
FK-CCR

A Commitment to Diagnostics

Principio del dosaggio

Il Flow2 CAST® è un test per la valutazione dell'attivazione dei basofili (BAT) che può essere utilizzato per la determinazione in vitro di reazioni allergiche immediate e ipersensibilità verso allergeni sospetti.

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



Numero di pazienti dosabili per kit:

1 allergene/ 1 conc.	25 pazienti
2 allergeni/ 1 conc.	20 pazienti
3 allergeni/ 2 conc.	10 pazienti

Caratteristiche del Test

Specificità

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

Recupero dei Basofili > 500 basofili/tubo

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

Precisione (Background paziente) 16.2 %CV

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

Precisione (Controllo Positivo) 5.4 %CV

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

Variazione Inter Operatori 3.7-8.1%CV

Due campioni dosati da cinque diversi tecnici nello stesso giorno.

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

Cut off

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

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

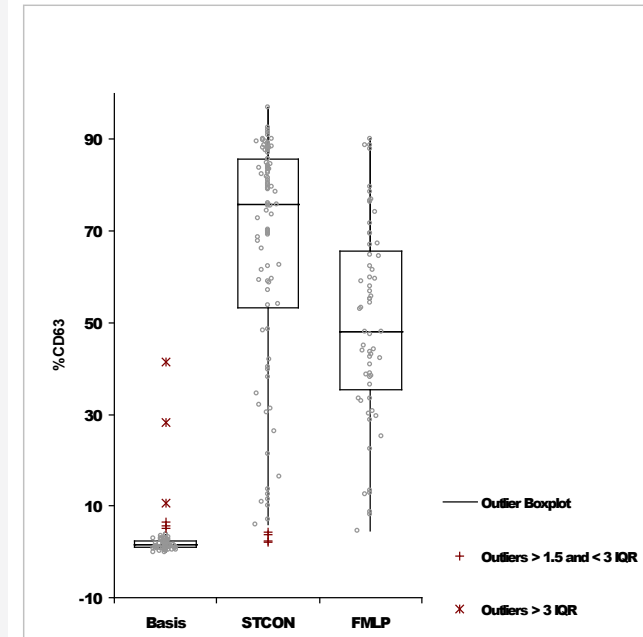


Figura 5: Box Plot di Controlli positivi e negativo in donatori sani. Basis: Background paziente (n=98); STCON: controllo positivo anti-FcεRI mAb (n=98); FMLP: controllo positivo fMLP.

Codice prodotto:
FK-CCR 100 tests

CAST® è un marchio depositato da BÜHLMANN Laboratories AG



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

Italy
info@buhlmannlabs.it
www.buhlmannlabs.it
Phone 800 870 643

