



Flow CAST®

Basophil Activation Test (BAT) Flow Cytometry

FK-CCR 100 tests

Revision date: 2012-08-17

ENGLISH

INTENDED USE

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

The test is intended for the *in vitro* diagnostic determination of expression of CD63 surface marker on basophils in whole blood by flow cytometry upon antigen stimulation.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The assay is based on the method first described by Sainte-Laudy *et al.* 1994 and 1996 (1,2) where basophil activation by allergens or controls is detected by flow cytometry measured by the increase of the CD63 (gp53) at the cellular surface. IgE and non-IgE mediated reactions can be detected (3-5).

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

As positive control, highly specific monoclonal antibody binding to the high affinity IgE binding receptor (FcεRI) or the unspecific cell activator fMLP is used.

Together with the cellular stimulation, Staining Reagent is added containing a mixture of monoclonal antibodies to human CD63 labeled with fluorescein isothiocyanate (anti-CD63-FITC) and to human chemokine receptor CCR3 labeled with phycoerythrin (anti-CCR3-PE). CCR3 is constitutively expressed on eosinophils and basophils (6,7) Erythrocytes are removed by a lysing reaction and after a short centrifugation step the 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
Stimulation Buffer containing calcium, heparin and IL-3	1 vial lyoph.	B-CCR-STB	Reconstitute with 50 ml of water ¹⁾
Stimulation Control anti-FcεRI mAb	1 vial lyoph.	B-CCR-STCON	Reconstitute with 1.5 ml of B-CCR-STB
Stimulation Control fMLP ²⁾	1 vial lyoph.	B-CCR-FMLP	Reconstitute with 1.5ml of B-CCR-STB
Staining Reagent Mix of anti-CD63-FITC and anti-CCR3-PE mAb	1 vial 2.2 ml	B-CCR-SR	Ready to use
Lysing Reagent ³⁾ 10x concentrated	1 vial 25 ml	B-CCR-LYR	Dilute with 225 ml of deionized water
Wash Buffer	1 vial 100 ml	B-CCR-WB	Ready to use

Table 1

¹⁾ For required water quality, see Chapter Procedural Notes

²⁾ N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

³⁾ Crystals may be formed during storage at 2-8°C and should be dissolved at 18-28°C prior to dilution.

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. Aliquot if repeated use is expected.
Stimulation Control	
Stimulation Control fMLP	Stable at -20°C for 6 months. Aliquot if repeated use is expected.
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 AND REAGENTS TO BE ORDERED ADDITIONALLY

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).

- 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.

ALLERGEN REAGENTS 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).

For the procedure to establish customer specific allergens for the CAST®-Assays ask your local distributor or contact BÜHLMANN.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- K-EDTA venipuncture tubes.
- Centrifuge for centrifugation at 500 x g.
- Disposable, pyrogen-free polypropylene or 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 10-50 µl adjustable dispenser.
- Cylinder 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 with 488 nm (blue) excitation wavelength including appropriate software (*cf.* chapter Flow cytometric Data Acquisition).

PRECAUTIONS

SAFETY PRECAUTIONS

- Stimulation Buffer (B-CCR-CSB) contains components of human origin. As material from human may contain infectious agents e.g. Hepatitis B virus and HIV. Therefore *patient samples and kit components should be handled as if capable of transmitting infections.*

TECHNICAL PRECAUTIONS

- Recommended Water Quality for the Flow CAST®. The use of sterile, ultrapure and apyrogenic water for reconstituting Stimulation Buffer (B-CCR-STB) 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 ultra filtrated in a periodically sanitized 10 kDa ultra filter.
- The Lysing Reagent (B-CCR-LYR) can 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.
- For cell stimulation and labeling reaction, the use of tissue culture grade microtiter plates is possible.
- Components must not be used after the expiry date printed on the labels. Do not mix different lots of reagents.
- Avoid contamination of reagents.
- It is important reading through the Instructions for Use prior to commencing the test. Reliable results will be obtained only if this Instruction for Use is followed accurately.
- Samples that are not properly handled may cause inaccurate results.
- Test results should be interpreted in conjunction with information available from clinical assessment of the patient and other diagnostic procedures.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

It is recommended that patients should avoid systemically administered antiallergenic drugs such as corticosteroids, chromoglycic acid (DSCG) for at least 24 hours prior to blood sampling.

Collect sufficient blood into **K-EDTA venipuncture tubes**. Fill the venipuncture tubes up to the dedicated volume with blood. Not sufficiently filled tubes (filling grade < 50%) lead to higher EDTA concentration in the sample and thus may give false negative results.

1 ml of whole blood is sufficient for about 18 test tubes.

Perform the cell stimulation immediately or store the blood sample refrigerated (2-8°C) for up to 48 hours. For detecting responses to drugs store the blood sample only up to 24 hours. **Do not centrifuge or freeze blood samples.**

ASSAY PROCEDURE

Important: The following procedure is optimized for whole blood specimen collected with EDTA as anticoagulant.

1. Mix the anti-coagulated blood sample by inverting the venipuncture tube several times.
2. Prepare fresh and pyrogen-free 3.5 ml polypropylene or 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 50 µl of the corresponding stimulus to each tube for each patient
PB tube: 50 µl of **Stimulation Buffer (background)**
PC1 tube: 50 µl of **Stimulation Control**
PC2 tube: 50 µl of **Stimulation Control fMLP**
Ax-y tube: 50 µl of **Allergen**
5. Add 100 µl of Stimulation Buffer to each tube.
6. Add 50 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 20 µl Staining Reagent to each tube.
9. Mix gently, 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 pre-warmed (18-28°C) Lysing Reagent to 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 300 µl of Wash Buffer.
- Note:** Depending on Flow cytometry instrumentation more wash buffer (e.g. 800 µl) might be necessary.
15. Vortex gently.
 16. Acquire the data on the flow cytometer within the same day. If the samples are stored for several hours it should be kept protected from light at 2-8°C.

Note: Samples stored, protected from light at 2-8°C over night are still analysable. A slight decrease of fluorescence intensity and a lower basophil recovery can be observed.

FLOW CYTOMETRIC DATA ACQUISITION

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

The flow cytometer must be equipped to detect Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC) and the two fluorochromes FITC and PE.

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

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

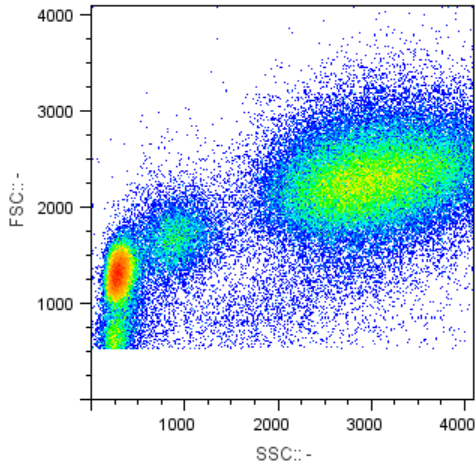


Figure 1: Three discrete populations (lymphocytes, monocytes and granulocytes) in FSC/SSC histogram.

Typically, after 500-600 basophilic cells (gated as shown in figure 2) the acquisition can be stopped. At least 200 basophilic cells must be analyzed, requiring a total amount of 50'000-100'000 leukocytes to be acquired per sample. Because of the lower activation percentage in drug allergies each laboratory has to define its own confidence limits (i.e. in drug allergies the limit of basophilic cells analyzed should be set to 300 or more).

DATA ANALYSIS

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

The analysis is based on two steps:

1. Set a gate 1 (R1) by including the entire basophil population CCR3^{pos} with low Side Scatter SSC^{low} (see Figure 2). eosinophils located on the high right side will be excluded due to their SSC^{high} position.
2. Calculate the percentage of CD63 positive cells (brightly fluorescent FITC; Q2) compared to the total amount of basophilic cells gated in R1 (see Figure 3 and Figure 4).

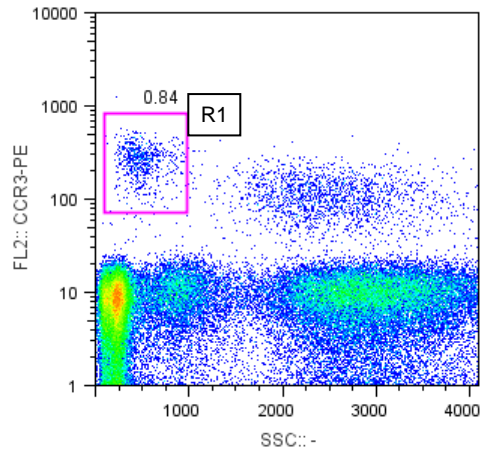
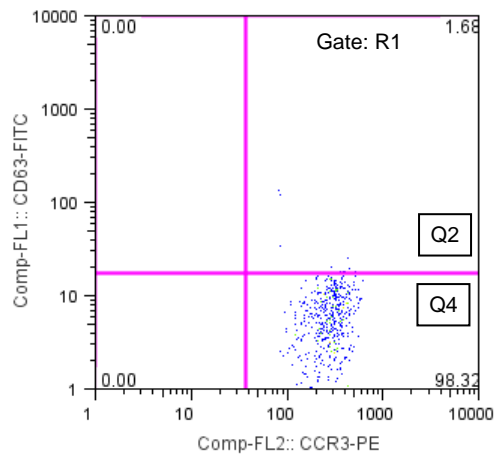
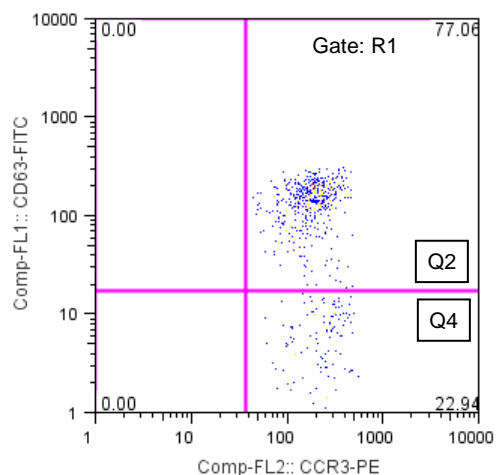


Figure 2: Selection of basophilic cells CCR3^{pos} / SSC^{low}



Gated Region	Count (n=)	%
Total	78251	100.0
R1	655	0.8
Q2 (CD63 ^{pos})	11	1.7
Q4 (CD63 ^{neg})	644	98.3

Figure 3: Patient Background (PB) with STB only



Gated Region	Count (n=)	%
Total	72916	100.0
R1	606	0.8
Q2 (CD63 ^{pos})	467	77.1
Q4 (CD63 ^{neg})	139	22.9

Figure 4: Stimulation Control (STCON)

LIMITATIONS

- Flow cytometry may produce false results if the cytometer has not been aligned perfectly, if the fluorescence emission has not been correctly compensated and if the 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 leucocytes.

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-offs.
- 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 positive cells) to fMLP and anti-FcεRI antibody. Evaluation of data from normal blood donors and patients showed that 6.1% (out of n=98) were non-responders to anti-FcεRI and 4.9 % (out of n=61) to fMLP.

INTERPRETATION OF 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 done with different basophil activation tests Bühlmann recommends using the following cut-off:

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.

ASSAY PERFORMANCE

Specificity: The anti-CCR3 mAb is a highly specific antibody described in 6 and 7. CCR3 is constitutively expressed on eosinophilic and basophilic leukocytes (see Fig. 2) and in a smaller part on CD3+ 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+ cells within the gated Basophil population was 3.9% (cf .Table 11)

Depending on the gating strategy used the relative amount of CD63+ basophils in Patient background (negative control) is very low. We analyzed 98 samples from normal blood donors and allergic patients. The median patient background was 1.5 % (95 % CI: 1.20 - 1.77 %). 6/98 samples showed a patient background >5 %.

Basophil Recovery: >500 basophils/stimulation tube. We analyzed 102 samples from normal blood donors and allergic patients. The median Basophil recovery was 526 cells (95% CI 481-578 basophils) stained with CCR3-PE.

Precision (Patient background): 16.2 % CV. The precision shows the reproducibility of the patient background within the same blood sample incubated 20 times with Stimulation Buffer and consecutively analyzed by flow cytometry. The results are expressed in Table 13 as percentage basophils activated and as mean fluorescence intensity (MFI) of CD63-FITC.

Precision (Positive control): 5.4 % CV. The precision shows the reproducibility of the stimulation within the same blood sample incubated 20 times with positive control (STCON) and consecutively analyzed by flow cytometry. The results are expressed in Table 13 as percentage basophils activated and as mean fluorescence intensity (MFI) of CD63-FITC.

Inter-Technician Variation (Positive control): 3.7-8.1 % CV. Two blood samples from normal blood donors were tested with the Flow CAST® by five different technicians within the same day. The two positive controls included into the kit, STCON and FMLP were used in duplicates.

The results are expressed in Table 14 as mean percentage basophils activated (CD63+) from double activation per technician.

Reference Intervals were established with normal blood donors (age 18-60). Median value for anti-FcεRI stimulated samples is 75.8 % (percentile 25th: 53.3 %, 75th: 85.6 %). Median value for fMLP stimulated samples is 48.1 % (percentile 25th: 35.4 %, 75th: 65.5%). Refer to Table 12.

ANWENDUNGSZWECK

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

Der Test wird für den in vitro diagnostischen Nachweis der Expression des CD63 Oberflächenmarkers auf Basophilen in Vollblut gebraucht, die nach Allergenstimulation im Durchflusszytometer bestimmt wird.

PRINZIP DER METHODE

Die zugrunde liegende Methode wurde erstmals von Sainte-Laudy et al. 1994 und 1996 (1,2) beschrieben. Die Aktivierung der Basophilen durch Allergene wird durch die erhöhte Expression von CD63 (Glykoprotein gp53) an der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie gemessen. Es können sowohl IgE vermittelte, wie auch nicht-IgE vermittelte Allergien nachgewiesen werden (3-5).

Allergene werden in Stimulationspuffer zu EDTA Vollblut von Patienten mit vermuteter Allergie/Hypersensitivität gegeben. Damit wird die in vivo Reaktion nachgestellt, bei der das an die Zelloberfläche gebundene spezifische IgE, kreuzvernetzt wird. Diese Reaktion aktiviert eine intrazelluläre Signalkaskade, welche zur Basophilenaktivierung führt. Während der Aktivierung verschmelzen intrazelluläre Bestandteile (Granula-Kompartimente), welche das transmembrane Protein CD63 enthalten, mit der Zellmembran und CD63 wird somit auf der extrazellulären Oberfläche exponiert.

Als Positivkontrollen werden je ein spezifischer monoklonaler Antikörper verwendet der den hochaffinen IgE bindenden Rezeptor (FcεRI) erkennt sowie N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) als unspezifischen Zellaktivator.

Gleichzeitig zur zellulären Stimulation wird das Färbereagenz dazugegeben. Dieses enthält ein Gemisch aus monoklonalen Antikörpern gegen humanes CD63, konjugiert mit Fluorescein Isothiocyanate (anti-CD63-FITC), sowie gegen den humanen Chemokinrezeptor CCR3, markiert mit Phycoerythrin (anti-CCR3-PE). CCR3 wird auf Eosinophilen und Basophilen konstitutiv exprimiert (6,7). 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 8).

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
Stimulations-Puffer enthält Kalzium, Heparin, IL-3	1 Flasche lyoph.	B-CCR-STB	Mit 50 ml H ₂ O ¹⁾ lösen
Stimulations-Kontrolle anti-FcεRI mAk	1 Flasche lyoph.	B-CCR-STCON	Mit 1.5 ml B-CCR-STB lösen
Stimulations-Kontrolle fMLP ²⁾	1 Flasche lyoph.	B-CCR-FMLP	Mit 1.5 ml B-CCR-STB lösen
Färbe-Reagenz anti-CD63-FITC und anti-CCR3-PE mAk	1 Flasche 2.2 ml	B-CCR-SR	Gebrauchsfertig
Lyse-Reagenz ³⁾ 10x konzentriert	1 Flasche 25 ml	B-CCR-LYR	Mit 225 ml deion. Wasser verdünnen
Wasch-Puffer	1 Flasche 100 ml	B-CCR-WB	Gebrauchsfertig

Table 3

¹⁾ Für die verlangte Wasserqualität siehe Kapitel Technische Hinweise.

²⁾ N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin

³⁾ Kristalle können bei einer Lagerung bei 2-8°C auftreten und sollten vor der Verdünnung bei 18-28°C wieder aufgelöst werden.

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	6 Monate bei -20°C haltbar. Bei wiederholtem Gebrauch aliquotieren.
Lyse-Reagenz	6 Monate bei 2-8°C haltbar.
Färbe-Reagenz	Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar.
Wasch-Puffer	

Table 4

ALLERGENE ERHÄLTICH AUF ANFRAGE

Validierte Allergene werden von BÜHLMANN zum Einsatz in CAST® Assays angeboten. Die entsprechenden Codenummern sind auf der BÜHLMANN Allergenliste auf der Internetseite: www.buhlmannlabs.ch aufgeführt.

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

Weitere Infos, siehe BÜHLMANN Allergen-Broschüre und Allergendatenblätter publiziert auf der BÜHLMANN Webseite, 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 Glycerol, Phenol, Natriumazid oder Merthiolat (Thimerosal).
Eine Anleitung zur Etablierung von Anwender spezifischen Allergenen ist auf Anfrage beim lokalen Distributor oder bei BÜHLMANN erhältlich.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- K-EDTA Blutentnahme Röhrchen.
- Zentrifuge für Zentrifugationen bei 500 x g.
- Pyrogen-freie Versuchsröhrchen aus Polypropylen oder Polystyren, mit einem entsprechenden Halter
HINWEIS: Die Polystyren-Röhrchen sollten mit dem verwendeten Durchflusszytometer kompatibel sein (z.B. 12 x 75 mm FALCON Röhrchen von Becton Dickinson; Art.-Nr.: 352052).
- Wirbelmischer (Vortex).
- Präzisionspipetten mit Pyrogen-freien Einwegspitzen für 10-100 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml, sowie 10-50 µl Spitzen für eine Multiinjektionspipette
- Zylinder 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.

- Bottle-top Dispenser für 1x Lyse Reagenz und Wasch-Puffer.
- Durchflusszytometer mit 488 nm Anregungswellenlänge (Argon-Ionen Laser) mit entsprechender Software (siehe Kapitel „Analyse mit Durchflusszytometer“).

VORSICHTSMASSNAHMEN

SICHERHEITSMASSNAHMEN

Stimulationspuffer (B-CCR-CSB) enthalten Komponenten menschlichen Ursprungs. Proben humanen Ursprungs können infektiös sein (z.B. Hepatitis B Virus und HIV). *Deshalb sollten Kitkomponenten und Patientenproben als infektiös betrachtet werden und mit den entsprechenden Vorsichtsmassnahmen behandelt werden.*

TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- EMPFOHLENE WASSERQUALITÄT FÜR DEN FLOW CAST®. Die Verwendung von ultrareinem und pyrogenfreiem Wasser zur Rekonstitution des Stimulations-Puffers (B-CCR-STB) 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 Probenröhrchen sollten daher stets abgedeckt werden. Zur Reduktion der Kontaminationsgefahr sollten die Laborfenster verschlossen bleiben. Auch evtl. vorhandene Hausstaubmilben oder Pollen von Zimmerpflanzen sind als potentielle Allergenquellen zu berücksichtigen. Wir empfehlen daher, die Zellpräparation und die Stimulationsschritte unter einem Laminar Flow Modul durchzuführen.
- Mikrotiter-Platten geeignet für Zellkulturen können ebenfalls für die Zellstimulation und Markierungsreaktion verwendet werden.
- Vermeiden Sie eine Kontamination der Reagenzien
- Es ist wichtig, vor Beginn des Tests die Arbeitsanleitung sorgfältig zu lesen. Verlässliche Ergebnisse werden nur erzielt, wenn diese Anleitung sorgfältig ausgeführt wird.
- Proben, die nicht korrekt behandelt werden können zu falschen Ergebnissen führen.
- Test Ergebnisse sollten in Verbindung mit klinischen Informationen, der Anamnese und den Ergebnissen anderer diagnostischer Verfahren interpretiert werden.

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Patienten unter systemisch antiallergischer Therapie sollten mindestens 24 Stunden vor der Blutentnahme keine Medikamente, wie Corticosteroide oder Chromoglycinsäure (DSCG) einnehmen.

Ausreichend Blut in **K-EDTA-Röhrchen** sammeln. Das Entnahmeröhrchen bis zur angegebenen Markierung füllen. Nicht ausreichend gefüllte Röhrchen (Füllmenge <50%) ergeben eine erhöhte EDTA Konzentration was zu falsch negativen Resultaten führen kann.

1 ml EDTA Vollblut reicht für ungefähr 18 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.**

ARBEITSANLEITUNG

Wichtig: Die folgende Anleitung wurde für Vollblutproben mit EDTA als Antikoagulanzen optimiert.

1. Durch mehrmaliges invertieren des Blutentnahmeröhrchens die Blutprobe mischen.
2. Vorbereiten neuer und pyrogenfreier Polypropylen oder Polystyren Röhrchen welche für die Messung am Durchflusszytometer geeignet sind.
3. Für jeden Patienten Röhrchen beschreiben. 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. 50 µl des entsprechenden Stimulus zu jedem Röhrchen für jeden Patienten zugeben.
PB Röhrchen 50 µl Stimulations-Puffer (Basis)
PC1 Röhrchen 50 µl Stimulations-Kontrolle
PC2 Röhrchen 50 µl Stimulations-Kontrolle fMLP
Ax-y Röhrchen 50 µl Allergen
etc.
5. 100 µl Stimulations-Puffer in jedes Röhrchen geben.
6. 50 µl Patienten Vollblut in jedes Röhrchen geben. Blutkontaminationen an Seitenwänden und Rand vermeiden.
7. Vorsichtig mischen.
8. 20 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 abgiessen und mit saugfähigem Papier 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.

Hinweis: Es ist möglich, vor Licht geschützte Proben nach einer über Nacht Lagerung (2-8°C) zu analysieren. Dabei muss aber mit einer leichten Abnahme der Fluoreszenz und der Basophilen-Wiederfindung (Recovery) gerechnet werden.

ANALYSE MIT DURCHFLUSSZYTOMETER

Die Analyse kann mit jedem Durchflusszytometer welches eine 488 nm Argonlaser-Diode besitzt (blau-grünes Excitationslicht) durchgeführt werden.

Das Durchflusszytometer muss mit Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC) und mit zwei Fluorochrom Kanälen für FITC und PE 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 Figure 1 (Seite 4) dargestellt zu erhalten, muss die Amplifikation (Gain) des FSC und SSC Signals gegebenenfalls angepasst werden. Siehe auch Produktbeschreibung/Anleitung des Durchflusszytometers.

Normalerweise kann die Datenerhebung nach ungefähr 500-600 Basophilen Zellen (siehe Figure 2, Seite 4) gestoppt werden. Um mindestens 200 Basophile Zellen zu analysieren, müssen etwa 50-100'000 Leukozyten erhoben werden. Aufgrund der tieferen Aktivierungsfrequenz bei Medikamentenallergien, muss jedes Labor seine eigene Vertrauenslimite definieren (d.h. bei Medikamentenallergien sollte die Mindestzahl an gezählten Basophilen bei 300 oder mehr liegen).

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 Basophilen Population CCR3^{pos} mit tiefem Side Scatter SSC^{low} eingeschlossen ist (Figure 2, Seite 4). Die Eosinophilen Population, welche auf der oberen rechten Seite (SSC^{high}) liegt, wird dabei ausgeschlossen.
2. Die Anzahl CD63 positive Zellen (FITC hell fluoreszierend; Q2) wird in Prozent aller Basophilen Zellen welche in Fenster R1 eingeschlossen wurden berechnet (siehe Figure 3 und Figure 4, Seite 4)

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:

- a) 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).
- b) **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.
- c) **Positive Kontrolle** (Stimulations-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.
- d) **Non-responder** sind Personen, die eine niedrige Reaktivität zu fMLP und anti-FcεRI Antikörper zeigen (<10 % CD63 positiver Zellen). Eine Auswertung von Blutspender- und Patientendaten ergab, dass 6.1 % (n=98) Non-responder auf anti-FcεRI und 4.9 % (n=61) auf fMLP waren.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Um eine optimale Sensitivität und Spezifität zu 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.

INTERPRETATION DER RESULTATE

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

Inhalations- Allergene:	≥15%	
Lebensmittel Allergene:	≥15%	
Hymenopterengifte:	≥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.

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 Figure 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 Basophilen Population betrug 3.9% (siehe Table 11).

Abhängig von der „Gating“-Strategie ist der relative Anteil von CD63⁺ Basophilen in der Patienten Basis (negativ Kontrolle) zumeist sehr gering. Proben von 98 Normalblutspendern und Allergikern wurden analysiert. Der Median der Basis betrug 1.5% (95% CI=1.20-1.77%). 6/98 Proben zeigten eine Basis >5%.

Basophilen Wiederfindung (Recovery): >500 Basophile/Stimulationsröhrchen. Es wurden 102 Proben von Normalblutspendern und Allergikern getestet. Der Median der Basophilen Wiederfindung betrug 526 Zellen (95% CI= 481-578 Basophile) welche mit CCR3-PE gefärbt wurden.

Präzision (Patienten Basis): 16.2 % CV. Die Präzision zeigt die Reproduzierbarkeit der Patienten Basis innerhalb der gleichen Blutprobe welche 20fach mit Stimulations-Puffer inkubiert und danach durchflusszytometrisch analysiert wurde. Die Resultate sind in Table 13 angegeben in Prozent aktivierter Basophilen und als „Mean fluorescence intensity“ (MFI) von CD63-FITC.

Präzision (Positiv Kontrolle): 5.4 % CV. Die Präzision zeigt die Reproduzierbarkeit der Patienten Basis innerhalb der gleichen Blutprobe welche 20fach mit der Positiv Kontrolle (STCON) inkubiert und danach durchflusszytometrisch analysiert wurde. Die Resultate sind in Table 13 angegeben in Prozent aktivierter Basophilen und als „Mean fluorescence intensity“ (MFI) von CD63-FITC.

Inter-Technician Variation (Positiv Kontrolle): 3.7 - 8.1 % CV. Zwei Proben von Normalblutspendern wurden mit dem Flow CAST[®] von fünf Labormitarbeitern innerhalb des gleichen Tages getestet. Die zwei im Kit enthaltenen Positiv Kontrollen STCON und FMLP wurden im Doppel angesetzt. Die Resultate sind in Table 14 als Mittelwert der Prozent aktivierten Basophilen (CD63⁺) pro Mitarbeiter angegeben.

Referenzintervalle wurden mit normalen Blutspendern im Alter von 18-60 ermittelt. Der Median für anti-FcεRI stimulierte Proben beträgt 75.8 % (25. Perzentile: 53.3 %, 75. Perzentile: 85.6 %). Der Median für fMLP stimulierte Proben beträgt 48.1 % (25. Perzentile: 35.4 %, 75 Perzentile: 65.5 %). Siehe Table 11.

DOMAINE D'UTILISATION

Le kit Flow CAST® est un test d'activation des basophiles (BAT) qui peut être utilisé pour la détection *in vitro* de réactions de type allergique immédiates et les hypersensibilités contre des allergènes suspectés. Le test s'applique à la détermination diagnostique *in vitro* de l'expression de marqueurs de surface CD63 sur des basophiles dans le sang complet, par cytométrie de flux, lors de la stimulation antigénique.

PRINCIPE DE DOSAGE

L'essai est basé sur la méthode initialement décrite par Sainte-Laudy *et al.* 1994 et 1996 (1,2) où l'activation des basophiles par des allergènes ou des contrôles est détectée par cytométrie de flux mesurée par l'augmentation des CD63 (gp53) à la surface de la cellule. Tant les réactions IgE-médiées que les non IgE-médiées peuvent être détectées (3-5).

Le tampon de stimulation et l'antigène sont ajoutés au sang complet traité à l'EDTA provenant de patients suspectés allergiques/hypersensibles. L'allergène mime la réaction *in vivo* où l'IgE spécifique lié à la surface de la cellule est ponté par l'allergène avéré et active une cascade de signalisation intracellulaire, qui conduit à l'activation des basophiles. En conséquence, les composés intracellulaires portant la protéine transmembranaire CD63 se fusionnent à la membrane cellulaire et par conséquent sont exposés à la matrice extracellulaire.

Comme contrôle positif, on emploie un anticorps monoclonal hautement spécifique se liant au récepteur de haute affinité reconnaissant l'IgE (FcεRI) ou l'activateur cellulaire non-spécifique fMLP.

Concomitamment à la stimulation cellulaire, on ajoute le réactif de coloration contenant un mélange d'anticorps monoclonaux aux CD63 humains marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (anti-CD63-FITC) et au récepteur humain de la chémokine CCR3 marqué à la phycoérythrine (anti-CCR3-PE). Le CCR3 est exprimé constitutivement sur les éosinophiles et les basophiles (6,7).

Les érythrocytes sont retirés par réaction de lyse et, après une courte étape de centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans le tampon de lavage et analysées par cytométrie de flux (voir en page 12 Acquisition de données par cytométrie de flux).

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Tampon de stimulation Contenant calcium, héparine et IL-3	1 flacon lyoph.	B-CCR-STB	Reconstituer avec 50 ml d'eau ¹⁾
Contrôle de stimulation anti-FcεRI mAb	1 flacon lyoph.	B-CCR-STCON	Reconstituer avec 1.5 ml de B-CCR-STB
Contrôle de stimulation fMLP²⁾	1 flacon lyoph.	B-CCR-FMLP	Reconstituer avec 1.5ml de B-CCR-STB
Réactif de coloration Mélange de anti-CD63-FITC et anti-CCR3-PE mAb	1 flacon 2.2 ml	B-CCR-SR	Prêt à l'emploi
Réactif de lyse ³⁾ Concentré 10x	1 flacon 25 ml	B-CCR-LYR	Diluer avec 225 ml d'eau déionisée
Tampon de lavage	1 flacon 100 ml	B-CCR-WB	Prêt à l'emploi

Table 5

¹⁾Pour la qualité d'eau requise, voir le Chapitre Notes Opératoires.

²⁾ N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine

³⁾ Des cristaux peuvent se former lors du stockage à 2-8°C et doivent être remis en solution à 18-28°C avant dilution.

STOCKAGE ET STABILITE DES REACTIFS

Réactifs non-ouverts	
Stocker à 2-8°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. Fractionner en aliquotes si on s'attend à un usage répété.
Contrôle de stimulation	
Contrôle de stimulation fMLP	Stable à -20°C pendant 6 mois. Fractionner en aliquotes si on s'attend à un usage répété.
Réactif de lyse	
Réactif de coloration	Stable à 2-8°C pendant 6 mois.
Tampon de lavage	
Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption	

Table 6

ALLERGENES FOURNIS SUR DEMANDE

Codes de commande: voir la liste des allergènes BÜHLMANN sur le site internet (www.buhmannlabs.ch)

- **Protéines allergènes:** Les protéines allergènes BÜHLMANN ne subissent pas un contrôle de qualité et sont envoyées sous forme liquide, concentrée (1µl/flacon).
- **Médicaments et produits chimiques allergènes:** Les allergènes de faible masse moléculaire BÜHLMANN sont envoyés sous forme lyophilisée et doivent être reconstitués avant l'emploi.

Se Référer au Livret Allergènes BÜHLMANN et feuillets de données allergènes disponible sur le site internet de BÜHLMANN (www.buhmannlabs.ch).

ALLERGENES PROVENANT D'AUTRES SOURCES

Des allergènes provenant d'autres sources peuvent être employés dans l'essai Flow CAST® avec les limitations suivantes :

- Aucun allergène matriciel (phase solide ou liquide).
- Aucune préparation d'allergènes contenant des produits cytotoxiques (stabilisants, agents de conservation) tels que glycérol, phénol, azoture de sodium ou merthiolate (thimérosal).

Pour la procédure d'établissement des allergènes spécifiques du client pour l'essai CAST®, veuillez vous adresser au distributeur local ou contacter BÜHLMANN.

MATERIELS NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Tubes pour ponction veineuse traités K-EDTA.
- Centrifugeuse pour centrifugation à 500 g.
- Tubes à essai disposables, en polypropylène apyrogène ou tubes à essai en polystyrène et support de tubes à essai pour la stimulation
NOTE: Les tubes en polystyrène doivent être adaptés au cytomètre de flux employé (*par exemple* tubes 12 x 75 mm FALCON venant de Becton Dickinson; code: 352052).
- Vortex Mixer.
- Pipettes de précision avec pointes disposables apyrogènes : Pipettes ajustables de 10-100 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml et dispensateur ajustable de 10-50 µl.
- Cylindre pour la préparation du tampon de stimulation.
- Eau Stérile, ultrapure et apyrogène pour la préparation des réactifs de stimulation (voir le Chapitre Notes Opératoires).
- Bain marie à 37°C.
- Eau distillée ou deionisée ainsi que bêche ou cylindre pour la préparation du réactif de lyse.

- Dispensateurs bouteille verticaux pour 1 x réactif de lyse et tampon de lavage, respectivement.
- Cytomètre de flux avec excitation à la longueur d'onde de 488 nm (bleu) muni du logiciel approprié (voir le chapitre Acquisition de données du cytomètre de flux).

PRÉCAUTIONS

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

- Le tampon de stimulation (B-CCR-CSB) contient des composants d'origine humaine. Les échantillons humains peuvent contenir des agents infectieux tels que le virus de l'hépatite B ou le VIH. *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.*

PRÉCAUTIONS TECHNIQUES

- QUALITE DE L'EAU RECOMMANDEE POUR LE FLOW CAST®. L'emploi d'une eau stérile, ultrapure et apyrogène pour la reconstitution du tampon de stimulation (B-CCR-STB), est essentiel pour une stimulation correcte et reproductible des basophiles. Les sources d'eau suivantes peuvent être employées: Eau qualité pour culture cellulaire, eau qualité pour infusion ou déionisée, eau de double distillation qui est ultra-filtrée dans un filtre 10 kDa périodiquement entretenu.
- Le réactif de lyse (B-CCR-LYR) peut être reconstitué avec de l'eau déionisée, doublement distillée ou une eau de la même qualité que celle qui est employée pour les réactifs de stimulation cellulaire.
- PRECAUTIONS POUR EVITER LA CONTAMINATION DE L'ALLERGENE DURANT LA STIMULATION CELLULAIRE. Des aéroallergènes dans le laboratoire peuvent contaminer des échantillons de sang ouverts et des suspensions de cellules provenant de patients, ce qui est susceptible de causer une élévation du background. En conséquence, on prendra soin de couvrir les échantillons sanguins et les tubes de stimulation cellulaire. Eviter les poussières, les plantes émettant du pollen, les gants en latex ou les équipements susceptibles de contenir du latex et ouvrir les fenêtres dans le laboratoire où on effectue la stimulation cellulaire. Nous recommandons par conséquent la préparation des cellules et les étapes de stimulation dans une hotte à flux laminaire.
- Pour la stimulation cellulaire et la réaction de marquage, l'emploi de PLAQUES MICROTITRES pour culture tissulaire est possible.
- Les composants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes. Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Éviter la contamination des réactifs.
- Lire intégralement le mode d'emploi avant de commencer le test et respecter strictement toutes les instructions, pour obtenir des résultats fiables.
- Les échantillons incorrectement manipulés peuvent donner des résultats inexacts.
- Les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte des informations résultant de l'examen clinique du patient et d'autres procédures diagnostiques.

COLLECTE DES ECHANTILLONS ET STOCKAGE

Il est recommandé que les patients s'abstiennent de prendre des médicaments anti-allergiques administrés par voie systémique tels que les corticostéroïdes ou l'acide chromoglycique (DSCG) au moins dans les 24 heures précédant la prise de sang.

Collecter suffisamment de sang dans des **tubes pour ponction veineuse K-EDTA**. Remplir les tubes à ponction veineuse jusqu'au volume indiqué avec du sang. Les tubes insuffisamment remplis (niveau de remplissage < 50%) conduisent à des concentrations supérieures en EDTA dans l'échantillon et ceci peut conduire à des résultats faussement négatifs.

1 ml de sang complet est suffisant pour environ 18 tubes à essai.

Procéder à la stimulation cellulaire immédiatement ou stocker l'échantillon de sang réfrigéré (2-8°C) jusqu'à 48 heures. Pour la détection des réactions de médicaments, le sang ne doit être conservé de plus de 24 heures. **Ne pas centrifuger ou geler des échantillons de sang.**

PROCEDURE

Important: Le mode opératoire suivant est optimisé pour les échantillons de sang complet collectés avec de l' EDTA comme anticoagulant.

1. Mélanger l'échantillon sanguin traité par l'anticoagulant en inversant le tube pour ponction veineuse plusieurs fois.
2. Préparer des tubes neufs et apyrogènes de 3.5 ml en polypropylène ou des tubes en polystyrène convenant pour des mesures par cytométrie de flux.
3. Pour chaque patient, marquer les tubes avec les indications comme par exemple:
PB : background du patient
PC1 : contrôle de stimulation par l'anti-FcεRI Ab
PC2 : contrôle de stimulation par le fMLP
A1-1 : pour l'antigène 1 avec la dilution 1
A1-2 : pour l'antigène 1 avec la dilution 2
etc.

Stimulation et coloration

4. Pipeter 50 µl du stimulus correspondant dans chaque tube pour chaque patient
Tube PB : 50 µl du **tampon de stimulation (background)**
Tube PC1 : 50 µl du **contrôle de stimulation**
Tube PC2 : 50 µl du **contrôle de stimulation fMLP**
Tube Ax-y : 50 µl de l'**Allergène**
5. Ajouter 100 µl de tampon de stimulation à chaque tube.
6. Pipeter 50 µl de sang complet du patient dans chaque tube. S'assurer que la paroi et le sommet du tube sont exempts de sang.
7. Mélanger légèrement.
8. Ajouter 20 µl de réactif de coloration dans chaque tube.
9. Mélanger légèrement, couvrir les tubes et incubé pendant 15 minutes à 37°C dans un **bain marie**. (L'utilisation d'un incubateur exigera environ 10 minutes d'incubation en plus, étant donné un échange de chaleur moins efficace).

Lyse

10. Ajouter 2 ml de réactif de lyse préchauffé (18-28°C) dans chaque tube, mélanger légèrement.
11. Incuber pendant 5 -10 minutes à 18-28°C.
12. Centrifuger les tubes pendant 5 minutes à 500 g.
13. Décanter le surnageant en utilisant du papier absorbant.
14. Suspendre le culot cellulaire dans 300 µl de tampon de lavage.

Note: En fonction de l'instrumentation de cytométrie de flux, une quantité plus importante de tampon de lavage (par ex. 800 µl) pourrait s'avérer nécessaire.

15. Vortexer légèrement.

16. Procéder à l'acquisition de données au cytomètre de flux le jour même. Si les échantillons sont stockés durant plusieurs heures, il faudra les protéger de la lumière à 2-8°C.

Note: Les échantillons stockés et protégés de la lumière à 2-8°C pour une nuit peuvent encore être évalués. Une faible diminution de l'intensité de fluorescence et un rendement plus faible en basophiles peuvent être observés.

ACQUISITION DE DONNEES PAR CYTOMETRIE DE FLUX

L'acquisition de données par cytométrie de flux peut être effectuée sur n'importe quel type de cytomètre de flux travaillant avec une diode laser à l'argon opérant à 488 nm (lumière d'excitation bleu-verte).

Le cytomètre de flux doit être équipé en vue de pouvoir détecter la diffraction aux petits angles (FSC), la réfraction à 90° (SSC) et les deux fluorochromes FITC et PE.

S'assurer que le cytomètre de flux est correctement aligné et que la compensation de couleur est opérationnelle.

Durant l'acquisition des échantillons, s'assurer que sur l'histogramme FSC/SSC la population des leucocytes est séparée en trois populations discrètes. Ajuster l'amplification (gain) des signaux FSC et SSC afin d'obtenir une distribution comme celle illustrée à la Figure 1 page 4. Se référer aux manuels d'utilisation du cytomètre de flux pour les instructions.

Typiquement, après 500 – 600 cellules de basophiles (captés comme montré à la Figure 2) l'acquisition peut être stoppée. Au minimum, 200 cellules de basophiles doivent être analysées, ce qui requiert une quantité totale de 50'000-100'000 leucocytes à mesurer par échantillon. Etant donné le faible pourcentage d'activation dans les allergies aux médicaments chaque laboratoire doit définir ses propres limites de confiance (c'est-à-dire que dans les allergies aux médicaments, le seuil limite de cellules de basophiles analysées devrait être fixé à 300 ou plus).

ANALYSE DES DONNEES

L'analyse des données acquises peut être effectuée au moyen de n'importe quel logiciel d'analyse par cytométrie de flux comme par exemple FlowJo, FloMax, CellQuest ou autres.

L'analyse s'effectue en deux étapes:

1. Fixer le gate 1 (R1) en incluant la population des basophiles entière CCR3^{POS} avec la diffraction aux petits angles SSC^{low} (voir Figure 2, page 4). Les éosinophiles situés sur le côté haut droit doivent être exclus vu leur position SSC^{high}.
2. Calculer le pourcentage de cellules CD63 positives (forte fluorescence au FITC; Q2) en comparaison avec la quantité totale de cellules basophiles captées en R1 (voir Figure 3 et Figure 4, page 4).

LIMITATIONS

- La cytométrie de flux peut produire des résultats erronés si le cytomètre de flux n'a pas été aligné parfaitement, si l'émission de fluorescence n'a pas été compensée correctement et si les régions n'ont pas été positionnées avec soin.

- Vérifier visuellement les préparations pour s'assurer de l'efficacité de la lyse. Les érythrocytes peuvent être incomplètement lysés et apparaissent sur un histogramme de diffraction lumineuse dans la même région que les leucocytes.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

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

- a) 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).
- b) **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.
- c) **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.
- d) **Les patients non répondeurs** présentent une réactivité faible (moins de 10 % de cellules CD63 positives) à fMLP et aux anticorps anti-FcεRI. L'analyse des résultats provenant de patients et de donneurs de sang normaux démontre que 6.1 % (pour n = 98) des personnes étudiées sont des non répondeurs à anti-FcεRI, et que 4,9 % (pour n = 61) sont des non répondeurs à fMLP.

INTERPRETATION DES RESULTATS

En vue d'obtenir une sensibilité et une spécificité optimales, des valeurs de cut-off légèrement inférieures devront être appliquées aux différents groupes d'allergènes. Sur la base de nombreuses études et évaluations effectuées au moyen de différents tests d'activation des basophiles, Bühlmann recommande l'utilisation des valeurs de cut-off suivantes:

Allergènes inhalés:	≥15 %	
Allergènes alimentaires:	≥15 %	
Venin d' Hymenoptera:	≥10 %	
Béta-lactames*:	≥5 %	SI ≥2
Analgésiques*:	≥5 %	SI ≥2
Additifs alimentaires*	≥5 %	SI ≥2

* Les médicaments et les autres allergènes chimiques produisent habituellement des pourcentages d'activation inférieurs aux autres allergènes. En conséquence, une valeur plus faible de cut-off devra être appliquée, mais l'indice de stimulation (SI = stimulation de l'allergène divisée par le contrôle négatif) doit être égal ou supérieur à 2 pour pouvoir considérer le résultat comme positif.

PERFORMANCE DU TEST

Spécificité: L'anti-CCR3 mAb est un anticorps hautement spécifique (6,7). CCR3 est exprimé constitutivement sur les leucocytes éosinophiles et basophiles (voir Figure 2) et dans une moindre proportion sur les cellules CD3⁺ (lymphocytes). Des échantillons de huit donneurs de sang normaux ont subi une double coloration à deux reprises avec les anti-CCR3-PE et anti-CD3-AF647. La quantité relative (moyenne) de cellules CD3⁺ au sein de la population des basophiles était de 3.9% (voir Table 11).

En fonction de la stratégie de capture utilisée, la quantité relative de basophiles CD63⁺ dans le background du patient (contrôle négatif) est très faible. Nous avons analysé 98 échantillons provenant de donneurs de sang normaux et de patients allergiques. La valeur moyenne du background du patient était de 1.5% (95% CI: 1.20 - 1.77%. Six échantillons sur 98 des échantillons ont montré une valeur de background du patient >5%.

Recouvrement des basophiles: tube >500 Basophiles/ stimulation. Nous avons analysé 102 échantillons provenant de donneurs de sang normaux et de patients allergiques. Le recouvrement moyen des basophiles était de 526 cellules (95% CI 481-578 basophiles) colorées au moyen du CCR3-PE

Précision (background du patient): 16.2 % CV. La précision indique la reproductibilité du background du patient lorsque le même échantillon de sang est incubé 20 fois avec le tampon de stimulation et analysé ensuite par cytométrie de flux. Les résultats sont exprimés en Table 13 comme pourcentage des basophiles activés et comme intensité moyenne de fluorescence (MFI) des CD63-FITC.

Précision (contrôle positif): 5.4 % CV. La précision indique la reproductibilité du background du patient lorsque le même échantillon de sang est incubé 20 fois avec le contrôle positif (STCON) et analysé ensuite par cytométrie de flux. Les résultats sont exprimés en Table 13 comme pourcentage des basophiles activés et comme intensité moyenne de fluorescence (MFI) des CD63-FITC.

Variation inter-technicien (contrôle positif): 3.7-8.1 % CV. Deux échantillons de sang provenant de donneurs de sang normaux ont été testés au moyen du Flow CAST[®] par cinq techniciens différents le même jour. Les deux contrôles positifs inclus dans le kit, à savoir les STCON et FMLP ont été utilisés en dupliqués.

Les résultats sont exprimés en Table 14 comme pourcentage moyen des basophiles activés (CD63⁺) résultant de la double activation par technicien.

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 75.8 % (25^e percentile : 53.3 %, 75^e : 85.6 %). La valeur médiane correspondant aux échantillons stimulés par fMLP est de 48.1 % (25^e percentile : 35.4 %, 75^e : 65.5 %). Consulter le Table 12.

USO PREVISTO

Il kit Flow CAST® 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 destinato all'uso nella determinazione diagnostica *in vitro*, tramite citometria a flusso, dell'espressione del marcatore di superficie CD63 sui basofili del sangue intero dopo stimolazione con l'antigene.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il test si basa sul metodo originariamente descritto da Sainte-Laudy *et al.* 1994 e 1996 (1,2), nel quale l'attivazione basofila da parte degli allergeni o dei controlli è determinata tramite la misurazione dell'aumento dell'espressione di CD63 (gp53) sulla superficie cellulare mediante citometria a flusso. Possono essere rilevate sia le reazioni IgE-mediate, sia le reazioni non IgE-mediate (3-5). Il Tampone di stimolazione e l'allergene vengono addizionati a campioni EDTA di sangue intero prelevati ai pazienti con sospetta allergia/ipersensibilità. L'allergene mima la reazione *in vivo*, nell'ambito della quale l'allergene responsabile forma un legame crociato con le IgE specifiche già legate alla superficie cellulare, con attivazione di una cascata intracellulare di segnali che inducono l'attivazione della cellula basofila. Come conseguenza, le componenti intracellulari legate alla proteina transmembrana CD63 si fondono con la membrana cellulare e vengono quindi esposte alla matrice extracellulare.

Come controllo positivo, il test si avvale di anticorpi monoclonali altamente specifici che legano 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 la molecola CD63 umana, marcati con isotiocianato di fluorescina (anti-CD63-FITC) e contro il recettore umano per le chemochine CCR3, marcato con ficoeritrina (anti-CCR3-PE). CCR3 è espresso costitutivamente su eosinofili e basofili (6,7).

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 pagina 16).

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Tampone di stimolazione Contenente calcio, eparina e IL-3	1 flaconcino liof.	B-CCR-STB	Ricostituire con 50 ml di acqua ¹⁾
Controllo di stimolazione mAb anti-FcεRI	1 flaconcino liof.	B-CCR-STCON	Ricostituire con 1,5ml di B-CCR-STB
Controllo di stimolazione fMLP ²⁾	1 flaconcino liof.	B-CCR-FMLP	Ricostituire con 1,5ml di B-CCR-STB
Reagente di colorazione Miscela di mAb anti-CD63-FITC e anti-CCR3-PE	1 flaconcino 2,2 ml	B-CCR-SR	Pronto per l'uso
Reagente di lisi ³⁾ Concentrato 10x	1 flaconcino 25 ml	B-CCR-LYR	Diluire con 225 ml di acqua deionizzata
Tampone di lavaggio	1 flaconcino 100 ml	B-CCR-WB	Pronto per l'uso

Table 7

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

²⁾ N-formil-metionil-leucil-fenilalanina

³⁾ Durante la conservazione a 2-8°C possono formarsi cristalli, che devono essere dissolti a 18-28°C prima della diluizione.

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	Stabile a -20°C per 6 mesi. Per l'uso ripetuto, aliquotare il reagente.
Reagente di lisi	Stabile a -2-8°C per 6 mesi.
Reagente di colorazione	
Tampone di lavaggio	Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza

Table 8

ALLERGENI FORNITI SU RICHIESTA

Codici di ordinazione: si rimanda all'elenco degli Allergeni BÜHLMANN sul sito web (www.buhmannlabs.ch)

- **Allergeni proteici:** gli allergeni proteici BÜHLMANN sono di qualità controllata e vengono forniti in forma liquida concentrata (1 µl/flaconcino).
- **Allergeni farmacologici e chimici:** gli allergeni BÜHLMANN di basso peso molecolare sono forniti in forma liofilizzata e devono essere ricostituiti prima dell'uso.

Si rimanda all'opuscolo Allergeni BÜHLMANN e ai fogli illustrativi degli allergeni disponibili sul sito web BÜHLMANN (www.buhmannlabs.ch).

ALLERGENI DI ALTRA PROVENIENZA

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

- Non allergeni legati a una matrice (fase solida o liquida).
- Non preparazioni allergeniche contenenti 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.

MATERIALI NECESSARI, MA NON FORNITI

- Provette K-EDTA per venipuntura.
- Centrifuga per centrifugazioni a 500 x g.
- Provette di analisi monouso apirogene in polipropilene o polistirene e portaprovette 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).
- Miscelatore vortex.
- Pipette di precisione con puntali monouso apirogeni: Pipette regolabili 10-100 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml e un dispensatore regolabile 10-50 µl.
- Cilindro graduato per la preparazione del Tampone di stimolazione.
- Acqua sterile, ultrapura e apirogena per la preparazione dei reagenti di stimolazione cellulare (*cf.* 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 1 x e il Tampone di lavaggio.
- Citometro a flusso con lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm (blu) e software idoneo (*cf.* paragrafo Acquisizione dati tramite citometria a flusso).

PRECAUZIONI

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

Il Tampone di stimolazione (B-CCR-CSB) contiene componenti di origine umana. I campioni umani possono contenere agenti infettivi, ad esempio virus dell'epatite B e HIV. *Pertanto occorre trattare tutti i campioni dei pazienti e i componenti del kit come potenzialmente infettivi e adottare misure precauzionali idonee.*

PRECAUZIONI TECNICHE

- QUALITÀ RACCOMANDATA DELL'ACQUA PER IL TEST FLOW CAST®. L'uso di acqua sterile, ultrapura e apirogena per la ricostituzione del Tampone di stimolazione (B-CCR-STB) è essenziale per una stimolazione basofila di buon livello e riproducibile. 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) può 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.
- Per la reazione di stimolazione e marcatura cellulare, è consentito servirsi di piastre da microtitolazione per colture cellulari.
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza stampata sulle etichette. Non mescolare diversi lotti di reagenti.
- Evitare la contaminazione dei reagenti.
- È importante consultare le Istruzioni per l'uso prima di iniziare il test. Soltanto seguendo esattamente le Istruzioni per l'uso si potranno ottenere risultati affidabili.
- I campioni manipolati in maniera inadeguata potrebbero dare risultati inesatti.
- I risultati del test devono essere interpretati assieme alle informazioni derivanti dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Si raccomanda di verificare che i pazienti non ricevano farmaci antiallergenici sistemici, come corticosteroidi o acido cromoglicico (DSCG), per almeno 24 ore prima del prelievo di sangue.

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 < 50%) aumenta la concentrazione di EDTA nel campione; ciò può essere causa di risultati falsamente negativi.

1 ml di sangue intero è sufficiente per circa 18 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 conserva il campione di sangue solo fino a 24 ore. **Non centrifugare o congelare i campioni ematici.**

PROCEDURA DEL DOSAGGIO

Importante: La procedura seguente è ottimizzata per campioni di sangue intero prelevati con l'anticoagulante EDTA.

1. Mescolare il campione ematico contenente l'anticoagulante capovolgendo diverse volte la provetta per venipuntura.
2. Preparare una serie di provette pulite e apirogene in polipropilene o polistirene da 3,5 ml, adatte per misurazioni con citometro a flusso.
3. 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'antigene 1 in diluizione 1
A1-2 per l'allergene 1 in diluizione 2
ecc.

Stimolazione e colorazione

4. Pipettare 50 µl dello stimolo corrispondente a ciascuna provetta di ciascun paziente
Provetta PB: 50 µl di **Tampone di stimolazione**
Provetta PC1: 50 µl di **Controllo di stimolazione**
Provetta PC2: 50 µl di **Controllo di stimolazione fMLP**
Provette Ax-y: 50 µl di **allergene**
5. Aggiungere a ciascuna provetta 100 µl di Tampone di stimolazione.
6. Pipettare 50 µl di sangue intero del paziente in ciascuna provetta. Assicurarsi che la parete laterale e la parte superiore della provetta siano prive di sangue.
7. Mescolare con delicatezza.
8. Aggiungere 20 µl di Reagente di colorazione a ciascuna provetta.
9. Mescolare con delicatezza, 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

10. Aggiungere a ciascuna provetta 2 ml di Reagente di lisi preriscaldato (18-28°C) e mescolare con delicatezza.
11. Incubare per 5 -10 minuti a 18-28°C.
12. Centrifugare le provette per 5 minuti a 500 x g.
13. Decantare il sovrantante su carta da filtro.
14. Risospendere il pellet cellulare con 300 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).

15. Mescolare con delicatezza sul vortex.

16. Acquisire i dati con il citometro a flusso il giorno stesso. Se i campioni vengono conservati per diverse ore, devono essere conservati al riparo dalla luce a 2-8°C.

Nota: I campioni conservati per una notte al riparo dalla luce a 2-8°C sono ancora utilizzabili. Possono verificarsi una lieve diminuzione dell'intensità di fluorescenza e un recupero minore di basofili.

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).

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

Verificare che il citometro a flusso sia allineato a livello ottimale e che sia 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, pagina 4. Per le relative istruzioni si rimanda al manuale del citometro a flusso.

Generalmente, dopo 500-600 cellule basofile (comprese in un "gate" definito, come indicato in Figura 2, pagina 4), l'acquisizione può essere interrotta. Devono essere analizzate almeno 200 cellule basofile, corrispondenti all'acquisizione di un totale di 50.000-100.000 leucociti per campione. Per via della minore percentuale di attivazione nelle allergie da farmaci, ciascun laboratorio deve definire i propri limiti di confidenza (vale a dire, nelle allergie da farmaci il limite delle cellule basofile analizzate deve essere impostato a 300 o più).

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:

1. Impostare un gate 1 (R1) che comprenda l'intera popolazione basofila CCR3^{pos} con Side Scatter basso SSC^{low} (vedere Figura 2, pagina 4). Gli eosinofili situati nella parte superiore destra verranno esclusi per via della loro posizione SSC^{high}.

2. Calcolare la percentuale di cellule CD63 positive (fortemente fluorescenti FITC; Q2) rispetto al numero totale di basofili situati in R1 (vedere Figura 3 e 4, pagina 4).

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:

- a) 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).
- b) **Controllo negativo** (controllo tampone): Un valore base per il singolo paziente di 2,0 - 2,5 % dei basofili attivati deve essere considerato negativo. Questa è stata anche la base per la determinazione delle soglie per allergeni specifici.
- c) **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. Se, in uno dei due controlli, si riscontra l'attivazione di un numero di basofili >**10%**, il campione è considerato valutabile.
- d) I "**non-responder**" sono individui con bassa reattività (<10% di cellule positive CD63) all'**fMLP** e all'anticorpo anti-Fc RI. La valutazione di dati da donatori di sangue e pazienti sani ha dimostrato la presenza di un 6,1% (per n=98 di non-responder rispetto all'anti-FcεRI e di un 4,9% (per n=61) di non-responder all'**fMLP**.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Per ottenere una sensibilità e una specificità ottimali, è opportuno stabilire valori soglia leggermente differenti per i diversi gruppi di antigeni. In base a numerosi studi e analisi effettuati con differenti test di attivazione basofila, Bühlmann raccomanda l'uso dei seguenti valori soglia:

Allergeni da inalazione:	≥15%	
Allergeni alimentari:	≥15%	
Veleni di imenotteri:	≥10%	
Betalattami*:	≥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 soglia inferiore, ma l'indice di stimolazione (IS = stimolazione allergenica diviso controllo negativo) deve essere uguale o superiore a 2 perché il risultato possa essere considerato positivo.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

Specificità: Il mAb anti-CCR3 è un anticorpo altamente specifico, descritto alle voci 6 e 7. 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 di 3,9 % (cfr. Table 11).

A seconda dei gate utilizzati, la quantità relativa di basofili CD63⁺ nel background paziente (controllo negativo) è molto bassa. Abbiamo analizzato 98 campioni prelevati a donatori di sangue sani e a pazienti allergici. Il background paziente mediano è stato di 1,5% (IC 95 %: 1,20 – 1,77 %). In 6/98 campioni, il background paziente è stato >5%.

Recupero di basofili: >500 basofili/provetta di stimolazione. Abbiamo analizzato 102 campioni provenienti da donatori di sangue sani e da pazienti allergici. Il recupero mediano di basofili è stato di 526 cellule (IC 95% 481-578 basofili) colorati con CCR3-PE.

Precisione (background paziente): CV 16.2%. La precisione mostra la riproducibilità del background paziente nello stesso campione ematico incubato 20 volte con Tampone di stimolazione e quindi analizzato tramite citometria a flusso. I risultati sono espressi in Table 13 come percentuale di basofili attivati e come intensità media di fluorescenza (IMF) di CD63-FITC.

Precisione (controllo positivo): CV 5.4%. La precisione mostra la riproducibilità della stimolazione nello stesso campione ematico incubato 20 volte con il controllo positivo (STCON) e quindi analizzato tramite citometria a flusso. I risultati sono espressi in Table 13 come percentuale di basofili attivati e come intensità media di fluorescenza (IMF) di CD63-FITC.

Variazione inter-tecnico (controllo positivo): CV 3.7-8.1%. Due campioni ematici di donatori di sangue sani sono stati analizzati lo stesso giorno con Flow CAST® da parte di cinque tecnici di laboratorio differenti. I due controlli positivi compresi nel kit, STCON e FMLP, sono stati usati in duplicato.

I risultati sono espressi in Table 14 come percentuale media di basofili attivati (CD63⁺) in seguito a doppia attivazione da parte di ciascun tecnico.

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 75.8 % (percentile 25° : 53.3 %, 75°: 85.6 %). Il valore mediano per campioni con stimolazione fMLP è risultato pari al 48.1% (percentile 25°: 335.4 %, 75°: 65.5%). Vedere Table 12.

INDICACIONES DE USO

El equipo Flow CAST® es una prueba de activación de basófilos (BAT) que puede emplearse para la detección *in vitro* de reacciones alérgicas de tipo inmediato e hipersensibilidades contra alérgenos sospechosos.

La prueba está destinada a la determinación *in vitro*, con files de diagnóstico, de la expresión del marcador de superficie CD63 en los basófilos en sangre completa, mediante citometría de flujo, después de la estimulación antigénica.

PRINCIPIO DEL ANÁLISIS

El análisis se basa en el método descrito por primera vez por Sainte-Laudy y cols. en 1994 y 1996 (1,2), en que la activación de los basófilos por alérgenos o controles se detecta mediante citometría de flujo, determinada por el aumento del CD63 (gp53) en la superficie celular. Pueden detectarse reacciones mediadas y no mediadas por IgE (3-5).

Se añaden tampón de estimulación y alérgeno a la sangre completa de pacientes con sospecha de alergia o hipersensibilidad, a la que se añade EDTA. El alérgeno imita la reacción *in vivo*, en que la IgE específica, unida a la superficie celular, forma puentes por el alérgeno ofensor y activa una cascada de señalización intracelular que lleva a la activación de los basófilos. En consecuencia, los compuestos intracelulares que llevan la proteína transmembrana CD63 se fusionan a la membrana celular y, por lo tanto, quedan expuestos a la matriz extracelular. Como control positivo, se usa la fijación de anticuerpos monoclonales altamente específicos a los receptores de unión de tipo IgE de gran afinidad (FcεRI) o el activador celular inespecífico fMLP.

Además de la estimulación celular, se añade reactivo de coloración, que contiene una mezcla de anticuerpos monoclonales contra el CD63 humano, marcado con isotiocianato de fluoresceína (anti-CD63-FITC) y contra el receptor de quimiocina humana CCR3 marcado con ficoeritrina (anti-CCR3-PE). El CCR3 se expresa constitutivamente sobre los eosinófilos y los basófilos (6, 7).

Los eritrocitos se extraen mediante una reacción de lisis y, después de un breve paso de centrifugado, las células se resuspenden en tampón de lavado y se analizan mediante citometría de flujo (véase Adquisición de datos de citometría de flujo, en la página 20).

REACTIVOS SUMINISTRADOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Tampón de estimulación que contiene calcio, heparina e IL-3	1 vial liof.	B-CCR-STB	Reconstituir con 50 ml de agua ¹⁾
Control de estimulación anti-FcεRI mAb	1 vial liof.	B-CCR-STCON	Reconstituir con 1,5 ml de B-CCR-STB
Control de estimulación fMLP ²⁾	1 vial liof.	B-CCR-FMLP	Reconstituir con 1,5 ml de B-CCR-STB
Reactivo de coloración Mezcla de anti-CD63-FITC y anti-CCR3-PE mAb	1 vial 2,2 ml	B-CCR-SR	Listo para usar
Reactivo de lisis ³⁾	1 vial 25 ml	B-CCR-LYR	Diluir con 225 ml de agua desionizada
Tampón de lavado	1 vial 100 ml	B-CCR-WB	Listo para usar

Table 9

¹⁾ Véase la calidad requerida del agua en el capítulo Notas de procedimiento

²⁾ N-formil-metionil-leucil-fenilalanina

³⁾ Pueden formarse cristales durante la conservación a 2 a 8 °C, y deberán disolverse a 18 a 28 °C antes de su dilución.

CONSERVACIÓN Y PERÍODO DE VALIDEZ DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Consérvese a una temperatura entre 2-8 °C. No lo utilice después de la fecha de caducidad impresa en el equipo.	
Reactivos sin abrir / reconstituídos	
Tampón de estimulación	Estable durante 6 meses a una temperatura de -20°C.
Control de estimulación	Obtener alícuotas si se espera un uso repetido.
Control de estimulación fMLP	Estable durante 6 meses a una temperatura de -20°C. Obtener alícuotas si se espera un uso repetido.
Reactivo de lisis	Estable durante 6 meses a una temperatura entre 2-8 °C.
Reactivo de coloración	Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad
Tampón de lavado	

Table 10

ALERGENOS SUMINISTRADOS PREVIO PEDIDO

Códigos de pedido: véase la lista de alérgenos BÜHLMANN en la página web (www.buhlmannlabs.ch)

Alérgenos de proteínas: Los alérgenos de proteínas BÜHLMANN se someten a un control de calidad y se envían en forma líquida y concentrada (1 µl/vial).

Alérgenos medicamentosos y químicos: Los alérgenos de bajo peso molecular BÜHLMANN se envían en forma liofilizada.

Consulte el folleto de alérgenos BÜHLMANN y las **Hojas de datos de alérgenos** que pueden consultarse en la página web de BÜHLMANN (www.buhlmannlabs.ch).

REACTIVOS DE ALERGENOS DE OTRAS FUENTES

Podrían emplearse alérgenos de otras fuentes en el análisis Flow CAST®, con las siguientes limitaciones:

- Ausencia de alérgenos unidos a la matriz (fase sólida o líquida).
- Ausencia de preparaciones de alérgenos que contienen compuestos citotóxicos (estabilizantes, conservantes) como glicerol, fenol, azida sódica o timerosal.

Sobre el procedimiento para establecer alérgenos específicos según el cliente para los análisis CAST®, pida información a su distribuidor local o póngase en contacto con BÜHLMANN.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Tubos de punción venosa con K-EDTA
- Centrifuga para centrifugación a 500 x g.
- Tubos de polipropileno o poliestireno, desechables y apirógenos, y gradillas adecuadas para tubos de ensayo, para la estimulación.
- NOTA: Los tubos de poliestireno deberán encajar con los tubos FALCON usados para citometría de flujo (por ejemplo, de 12 x 75 mm, de Becton Dickinson; código: 352052).
- Mezclador de vórtice.
- Pipetas de precisión con puntas desechables y apirógenas: de 10 a 100 µl, de 100 a 1000 µl, pipeta ajustable de 1 a 5 ml y un dispensador ajustable de 10 a 50 µl.
- Cilindro para la preparación del tampón de estimulación.
- Agua estéril, ultrapura y apirógena para la preparación de reactivos de estimulación celular (véase el capítulo Notas de procedimiento).
- Baño de agua graduado a 37 °C.
- Agua destilada o desionizada, y también vaso de precipitados o cilindro para la preparación del reactivo de lisis.

- Sendos dispensadores con parte superior de frasco para 1 x reactivo de lisis y tampón de lavado.
- Citómetro de flujo con longitud de onda de excitación de 488 nm (azul), incluido el programa informático adecuado (véase el capítulo Adquisición de datos de citometría de flujo).

MEDIDAS DE PRECAUCIÓN

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Il Tampone di stimolazione (B-CCR-CSB) contiene material de origen humano. Los componentes de origen humano pueden contener agentes infecciosos, p.ej. virus de la hepatitis B y VIH. Entonces, las muestras de los pacientes deberán manipularse como si pudieran transmitir infecciones y deberán tomarse las precauciones que sean razonables.

MEDIDAS DE PRECAUCIÓN TÉCNICAS

- CALIDAD RECOMENDADA DEL AGUA PARA EL FLOW CAST®. El uso de agua estéril, ultrapura y apirógena para la reconstitución del tampón de estimulación (B-CCR-STB) es fundamental para una estimulación correcta y reproducible de los basófilos. Pueden emplearse las siguientes fuentes de agua: Agua con calidad para cultivo de células, agua con calidad para infusión o desionizada, agua doblemente destilada que se somete a ultrafiltración en un ultrafiltro de 10 kDa, periódicamente sanitizado.
- El reactivo de lisis (B-CCR-LYR) puede reconstituirse con agua desionizada, doblemente destilada, o con agua de la misma calidad que la usada para los reactivos para la estimulación de células.
- PRECAUCIONES PARA EVITAR LA CONTAMINACIÓN CON ALERGENOS DURANTE LA ESTIMULACIÓN CELULAR: Los aeroalergenos en el laboratorio pueden contaminar muestras de sangre abiertas y suspensiones de células de pacientes, lo que podría causar una liberación de fondo elevada. Por lo tanto, debe tenerse la precaución de cubrir las muestras de sangre y los tubos de estimulación de células. Deben evitarse los ácaros del polvo, las plantas polinizantes, los guantes de látex o los equipos que puedan contener látex, y las ventanas abiertas en el laboratorio en el que se realiza la estimulación de las células. Por lo tanto, recomendamos la realización de los pasos de preparación y estimulación de las células en una cámara de flujo laminar.
- Para la reacción de estimulación y marcado de las células, es posible el uso de placas de microtitulación con calidad para cultivo de células.
- Los componentes no se deben utilizar más allá de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas. No se deben mezclar reactivos de lotes diferentes.
- Evite la contaminación de los reactivos.
- Es importante leer bien las instrucciones de uso antes de comenzar el análisis. Únicamente se obtendrán resultados fiables si se siguen con precisión estas instrucciones.
- Una manipulación incorrecta de las muestras puede dar lugar a la obtención de resultados inexactos.
- Los resultados del análisis deben interpretarse de manera conjunta con la información obtenida de la valoración clínica del paciente y otros procedimientos diagnósticos.

RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se recomienda a los pacientes que eviten la administración sistemática de antialérgicos como los corticosteroides y el ácido cromoglucólico (DSCG), por lo menos durante 24 horas antes de la extracción de la sangre.

Extráigase una cantidad suficiente de sangre en **tubos para punción venosa con K-EDTA**. Rellene los tubos para punción venosa hasta el volumen indicado con sangre. No todos los tubos suficientemente llenados (grado de llenado < 50%) llevan a una concentración más alta de EDTA en la muestra; por lo tanto, pueden dar resultados falsamente negativos.

1 ml de sangre completa es suficiente para aproximadamente 18 tubos de ensayo.

Realice la estimulación celular inmediatamente o conserve la muestra de sangre en refrigeración (entre 2 y 8 °C) un periodo de hasta 48 horas. Para la detección de las respuestas a las drogas tienda de la muestra de sangre sólo hasta 24 horas. **Las muestras de sangre no deben centrifugarse ni congelarse.**

PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS

Importante: Se ha optimizado el siguiente procedimiento para las muestras de sangre completa extraídas con EDTA como anticoagulante.

1. Mezcle la muestra de sangre anticoagulada, invirtiendo varias veces el tubo de punción venosa.
2. Prepare tubos de polipropileno o poliestireno de 3,5 ml, nuevos y apirógenos, adecuados para determinaciones de citometría de flujo.
3. Por cada paciente, rotule los tubos, por ejemplo:
PB = fondo del paciente
PC1 = control de estimulación con anti-FcεRI Ab
PC2 = control de estimulación con fMLP
A1-1 para el antígeno 1 con dilución 1
A1-2 para el alérgeno 1 con dilución 2
etc.

Estimulación y coloración

4. Pipetee 50 µl del estímulo correspondiente a cada tubo por cada paciente.
Tubo PB: 50 µl de **tampón de estimulación (fondo)**
Tubo PC1: 50 µl de **control de estimulación**
Tubo PC2: 50 µl de **Control de estimulación fMLP**
Tubo Ax-y: 50 µl de **Alérgeno**
5. Añada a cada tubo 100 µl de tampón de estimulación.
6. Pipetee en cada tubo 50 µl de sangre completa de los pacientes. Compruebe que la pared lateral y la parte superior del tubo no tengan sangre.
7. Mezcle suavemente.
8. Añada a cada tubo 20 µl de reactivo de coloración.
9. Mezcle suavemente, cubra los tubos e incube durante 15 minutos a 37 °C, en un **baño de agua**.
(Si usa una incubadora, el tiempo de incubación tardará aproximadamente 10 minutos más debido a una transferencia menos eficiente del calor.)

Lisis

10. Añada a cada tubo 2 ml del reactivo de lisis precalentado (de 18 a 28 °C) y mezcle suavemente.
11. Incube durante 5 a 10 minutos, a 18 a 28 °C.
12. Centrifugue los tubos durante 5 minutos a 500 x g.

13. Decante el sobrenadante con papel secante.
14. Resuspenda la microesfera de células con 300 µl de tampón de lavado.

Nota: Dependiendo del instrumental de citometría de flujo, puede ser necesaria una mayor cantidad de tampón de lavado (por ejemplo, 800 µl).

15. Mezcle en vórtice suavemente.
16. Adquiera los datos en el citómetro de flujo, el mismo día. Si las muestras se conservan durante varias horas, deberán mantenerse protegidas de la luz, a una temperatura entre 2 y 8 °C.

Nota: Las conservadas y protegidas de la luz, a una temperatura entre 2 y 8 °C, de un día para otro, todavía son evaluables. Pueden esperarse una ligera disminución de la intensidad de la fluorescencia y una menor recuperación de los basófilos.

ADQUISICIÓN DE DATOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

La adquisición de citometría de flujo puede realizarse con cualquier citómetro de flujo que funcione con un diodo de láser de argón de 488 nm (luz de extracción azul-verde).

El citómetro de flujo debe estar equipado para detectar dispersión hacia delante (FSC), dispersión lateral (SSC) y los dos fluorocromos FITC y PE.

Compruebe que el citómetro de flujo esté correctamente alineado y que la compensación de color esté ajustada.

Durante la adquisición de las muestras, compruebe que el histograma de FSC/SSC de la población de leucocitos se separe en tres poblaciones discretas. Ajuste la amplificación (ganancia) de las señales de FSC y SSC para obtener una distribución que se muestra en la figura 1, página 4. Consulte las instrucciones de los manuales del citómetro.

Característicamente, después de 500 a 600 células basófilas (obturadas como se muestra en la figura 2, página 4), la adquisición puede detenerse. Deben analizarse por lo menos 200 células basófilas, lo que requiere una cantidad total de 50.000 a 100.000 leucocitos para adquirir por muestra. Debido al menor porcentaje de activación en las alergias medicamentosas, cada laboratorio debe definir sus propios límites de confianza (es decir, en las alergias medicamentosas, el límite de basófilos analizados debe ajustarse a 300 o más).

ANÁLISIS DE LOS DATOS

El análisis de los datos adquiridos puede realizarse con cualquier programa informático de análisis de citometría de flujo (por ejemplo, FlowJo, FloMax, CellQuest u otros).

El análisis se basa en dos pasos:

1. Ajuste un obturador 1 (R1), incluyendo toda la población de basófilos CCR3^{pos} con SSC^{low} de dispersión lateral (Side Scatter) baja (vea la figura 2, página 4). Los eosinófilos localizados arriba, a la derecha, serán excluidos debido a su posición SSC^{high}.
2. Calcule el porcentaje de células positivas para CD63 (FITC con fluorescencia brillante; Q2), en comparación con la cantidad total de basófilas obturadas en R1 (véanse las figuras 3 y 4, página 4).

LIMITACIONES

- La citometría de flujo puede dar resultados falsos si el citómetro de flujo no se ha alineado perfectamente, si la emisión de fluorescencia no se ha compensado correctamente y si las regiones no se han colocado cuidadosamente.

- Compruebe macroscópicamente las preparaciones, para evaluar la eficacia de la lisis. Los eritrocitos pueden lisarse incompletamente y pueden aparecer en un histograma de difracción de la luz en la misma localización que los leucocitos.

CONTROL DE CALIDAD

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

- a) 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).
- b) **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.
- c) **Control positivo** (control de estimulación): En el kit se incluyen dos controles positivos diferentes. El **anticuerpo monoclonal Anti-FcεRI** 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.
- d) Se considera **sin respuesta** a las personas con baja reactividad (<10% de células positivas para CD63) frente a fMLP y anticuerpo anti-FcεRI. La evaluación de datos de donantes de sangre normales y pacientes mostró que un 6,1% (de n=98) eran personas sin respuesta frente a anti-FcεRI y un 4,9% (de n=61) frente a fMLP.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para obtener una sensibilidad y especificidad óptimas, deberán aplicarse valores umbrales ligeramente diferentes para grupos diferentes de alérgenos. A partir de numerosos estudios y evaluaciones efectuados con diferentes pruebas de activación de basófilos, Bühlmann recomienda el uso de los siguientes valores umbrales:

Alérgenos de alimentos:	≥ 15%	
Venenos de himenópteros:	≥ 10%	
Betalactamos*:	≥ 5%	SI ≥ 2
Analgésicos*:	≥ 5%	SI > 2
Aditivos de alimentos*:	≥ 5%	SI > 2

* Los fármacos y otros alérgenos químicos producen generalmente porcentajes de activación más bajos que otros alérgenos. Por lo tanto, deberá obtenerse un valor umbral más bajo, pero el índice de estimulación (SI = estimulación del alérgeno dividida por el control negativo) debe ser igual o superior a 2 para que el resultado se considere positivo.

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Especificidad: El anti-CCR3 mAb es un anticuerpo altamente específico, descrito en 6 y 7. CCR3 se expresa constitutivamente en los leucocitos eosinófilos y basófilos (véase la figura 2) y en una proporción menor de linfocitos CD3⁺. Las muestras de ocho donantes de sangre normales se colorearon dos veces con anti-CCR3-PE y anti-CD3-AF647. La cantidad relativa (media) de linfocitos CD3⁺ con la población de basófilos obturados fue del 3,9% (véase Table 11)..

Dependiendo de la estrategia de obturación usada, la cantidad relativa de basófilos CD63⁺ en el fondo de pacientes (control negativo) es muy baja. Analizamos 98 muestras de donantes de sangre normales y pacientes alérgicos. La mediana del fondo de pacientes fue del 1,5% (IC 95%: 1,20 – 1,77%). 6/98 muestras mostraron un fondo de pacientes > 5%.

Recuperación de basófilos: > 500 basófilos / tubo de estimulación. Analizamos 102 muestras de donantes de sangre normales y pacientes alérgicos. La mediana de la recuperación de basófilos fue de 526 células (IC 95%: 481 – 578 basófilos) colorados con CCR3-PE.

Precisión (fondo de pacientes): 16,2% CV. La precisión muestra la reproducibilidad del fondo de pacientes dentro de la misma muestra de sangre incubada 20 veces con tampón de estimulación y analizada consecutivamente mediante citometría de flujo. Los resultados expresados en Table 13 como porcentaje de basófilos activados y como intensidad de fluorescencia media (MFI) de CD63-FITC.

Precisión (control positivo): 5,4% CV. La precisión muestra la reproducibilidad de la estimulación dentro de la misma muestra de sangre incubada 20 veces con control positivo (STCON) y analizada consecutivamente mediante citometría de flujo. Los resultados expresados en Table 13 como porcentaje de basófilos activados y como intensidad de fluorescencia media (MFI) de CD63-FITC.

Variación entre técnicos (control positivo): 3,7- 8,1% CV. Se examinaron dos muestras de sangre de donantes de sangre normales con el FlowCAST, por técnicos diferentes, en el mismo día. Los dos controles positivos incluidos en el equipo, STCON y FMLP; se usaron por duplicado. Los resultados expresados en Table 14 como porcentaje de basófilos activados (CD63⁺) con respecto a la doble activación por técnico.

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-FcεRI es un 75.8 % (percentil 25: 53.3 %; percentil 75: 85.6 %). La mediana para muestras estimuladas con fMLP es un 48.1 % (percentil 25: 35.4 %; percentil 75: 65.5 %). Véase la Table 12.

Table 11 Specificity

n	16
Mean	3.85%
95% CI	2.52 – 5-18%
SD	2.50%
Median	3.10%
97.9% CI	1.70 – 5.54%

Table 13 Precision

	Patient Background		STCON	
	%CD63+	MFI CD63+	%CD63+	MFI CD63+
Mean	2.4%	10.1	35.5%	82.1
SD	0.4%	0.8	1.9%	7.2
%CV	16.2%	7.7%	5.4%	8.8%

Table 12 Reference Intervals

	n	%CD63 ^{pos}		
		Median	2.5 th – 97.5 th percentile	25 th – 75 th percentile
STCON	98	75.8	3.4 – 92.0	53.3 – 85.6
fMLP	61	48.1	7.6 – 88.9	35.4 – 65.5

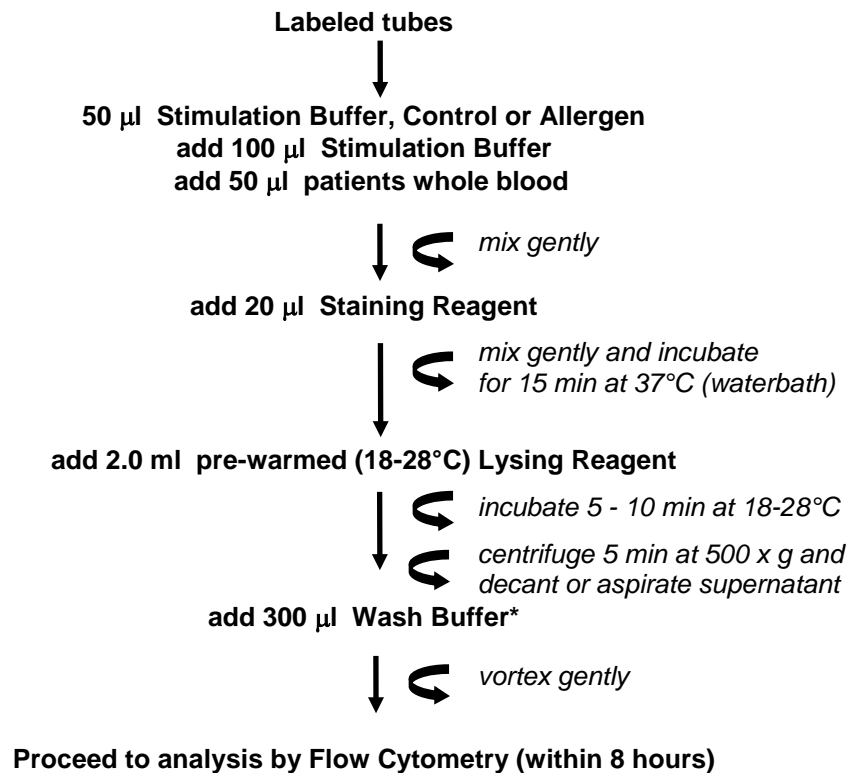
Table 14 Inter Technician Variation

	S1 (%CD63+)		S2 (%CD63+)	
	STCON	FMLP	STCON	FMLP
Mean	64.8	42.2	69.6	48.1
SD	3.6	1.6	2.6	3.9
%CV	5.6%	3.7%	3.7%	8.1%

APPENDIX II
REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ RÉFÉRENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS

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.





Flow CAST®



TIME TO RESULT: ~ 1 HOUR

* **Note:** Depending on Flow cytometry instrumentation more wash buffer (e.g. 800 µl) might be necessary.

APPENDIX II
SYMBOLS/SYMBOLE/ SYMBOLES/SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo N�mero de cat�logo
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für „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
BUF STIM	Stimulation Buffer Stimmulations-Puffer Tampon de stimulation tampone di stimolazione Tampón de estimulación
CONTROL STIM	Stimulation Control Stimulationskontrolle Contrôle de stimulation Controllo di stimolazione Control de estimulación
CONTROL FMLP	Stimulation Control fMLP Stimulationskontrolle fMLP Contrôle de stimulation fMLP Controllo di stimolazione fMLP Control de estimulación fMLP
REAG STAIN	Staining Reagent F�rbe-Reagenz Réactif de coloration Reagente di colorazione Reactivo de coloración
REAG LYS	Lysing Reagent Lyse Reagenz Réactif de lyse Reagente di lisi Reactivo de l�sis
BUF WASH	Wash Buffer Wasch-Puffer Tampon de lavage tampone di lavaggio Tampón de lavado

