



Flow CAST®

Procédure

FK-CCR

A Commitment to Diagnostics

Pré-Analytique

- Echantillons requis** Sang complet EDTA
- Stockage des échantillons** 2-8°C jusqu'à 48 heures. (allergies médicamenteuses 24 heures seulement)
Ne pas congeler ou centrifuger.
- Collecte des Echantillons** Le sang doit être prélevé avant le test cutané ou le test de provocation *in vivo*.
Les tubes de ponction veineuse EDTA doivent être remplis >50 %.
- Patient** Tout traitement médicamenteux tel que la prise d'anti-histaminiques, corticostéroïdes ou acide chromoglycique doit être stoppé 24 heures avant le prélèvement.

Matériel nécessaire

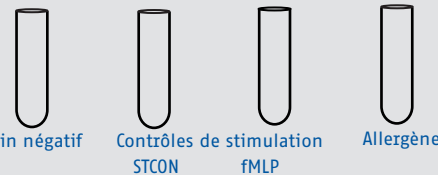
- Bain-marie, incubateur (37°C)
- Cytomètre en flux avec une diode laser à l'argon opérant à 488 nm et les quatre paramètres suivants :
1. Forward scatter (FSC), 2. Side scatter (SSC) et
3.-4. Canaux pour détecter les fluorochromes FITC et PE (FL1, FL2).

Allergènes BÜHLMANN

- Reconstituer les allergènes avec 250 µl de tampon de stimulation.
- Jusqu'à 4 stimulations par flacon.
- Utiliser des allergènes fraîchement reconstitués pour la stimulation.
- Les allergènes d'abeille et de guêpe (BAG2-I1/-I3) une fois reconstitués sont stables 1 mois à -20°C.

Stimulation/Coloration et Lyse

- Préparer différents tubes
- Témoin négatif (TN)
 - Contrôles de stimulation (Ac anti-FcεRI ; fMLP)
 - Allergène



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

Ajouter 100 µl de tampon de stimulation

Ajouter 50 µl de sang complet EDTA du patient

Mélanger doucement

Ajouter 20 µl de réactif de coloration

Mélanger doucement et incuber 15 minutes à 37°C au bain-marie ou 25 minutes dans un incubateur

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

Incuber 5-10 minutes à 18-28°C

Centrifuger 5 minutes à 500 x g et décanter ou aspirer le surnageant

Ajouter 300 µl de tampon de lavage*

Vortexer doucement

Acquérir les données grâce à la cytomètre en flux

* Selon le cytomètre en flux utilisé, utiliser plus de tampon de lavage (par ex. 800 µl).

Résultats disponibles en ~60 minutes

Acquisition des données

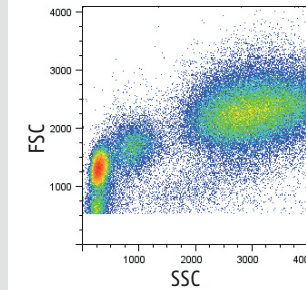


Figure 1 : 3 populations distinctes; lymphocytes, monocytes et granulocytes sur l'histogramme FSC/SSC.

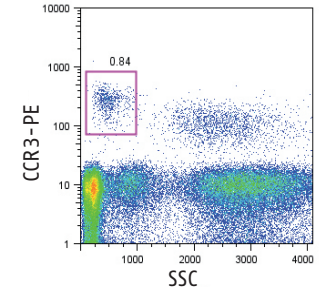
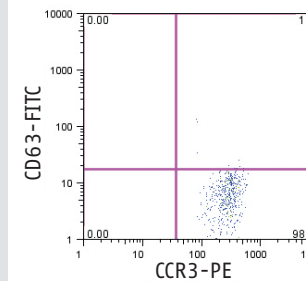
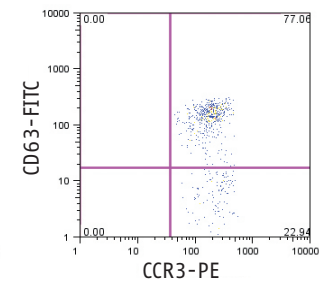


Figure 2 : sélection des basophiles CCR3^{pos} / SSC^{bas}



Fenêtres de lecture	Compte (n=)	%
Total	602	100.0
Q2 (CD63 ^{pos})	11	1.7

Figure 3 : Témoin négatif (PB) avec uniquement le tampon de stimulation.



Fenêtres de lecture	Compte (n=)	%
Total	650	100.0
Q2 (CD63 ^{pos})	467	77.1

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





Flow CAST®

Caractéristiques

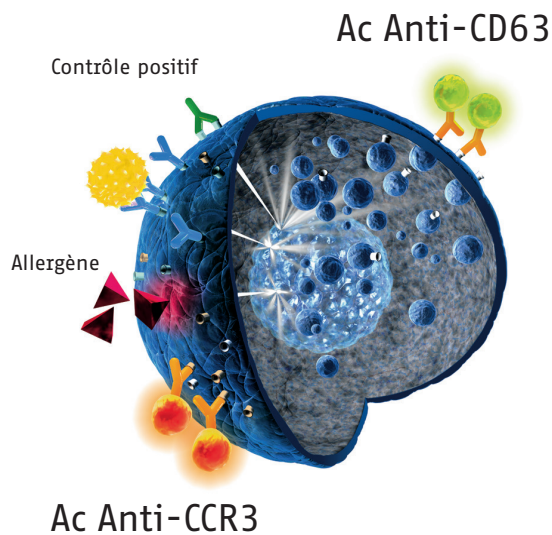
FK-CCR

A Commitment to Diagnostics

Domaine d'utilisation

Le kit Flow CAST® est un test d'activation des basophiles (TAB) pouvant être utilisé pour la détection *in vitro* des réactions allergiques de type immédiates et les hypersensibilités.

Il est prévu pour le diagnostic *in vitro* de l'expression du CD63 comme marqueur de surface des basophiles, le tout sur sang complet par cytométrie en flux après stimulation allergénique.



Nombre de tests réalisables par kit

1 Allergène/1 conc.	25 patients
2 Allergènes/1 conc.	20 patients
3 Allergènes/2 conc.	16 patients

Caractéristiques du test

Spécificité

Le CCR3 est exprimé de façon constitutive sur les leucocytes éosinophiles et les basophiles et en partie sur les cellules CD3⁺ (lymphocytes). Les échantillons de 8 donneurs de sang normaux ont été doublement marqués à l'aide d'un anti-CCR3-PE et d'un anti-CD3-AF647. Le montant relatif (moyenne) de cellules CD3⁺ au sein de la population de basophiles était de 3.9 % (95 % IC : 2.5-5.2 %).

Recouvrement des basophiles >500 basophiles/tube

102 échantillons provenant de donneurs normaux et de patients allergiques donnent une médiane à 526 cellules (95 % IC : 481-578 basophiles)

Précision (Témoin négatif du patient) 16.2 % CV

Le même échantillon de sang est incubé 20 x avec le tampon de stimulation et analysé ensuite. Moyenne : 2.4 % ; ET : 0.4 %

Précision (Contrôle de stimulation positif) 5.4 % CV

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

Variation inter-techniciens 3.7-8.1 % CV

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

anticorps anti-FcεRI **Moyenne : 69.6 % ; ET : 2.6 %**

fMLP **Moyenne : 48.1 % ; ET : 3.9 %**

Valeurs seuil

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

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

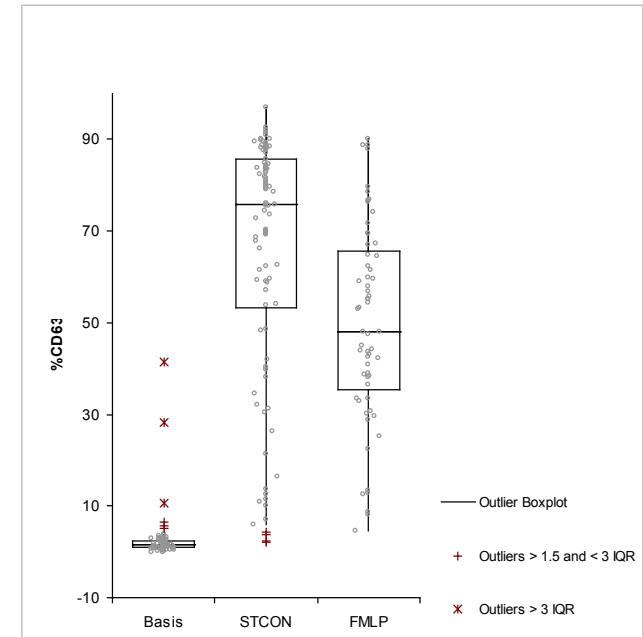


Figure 5 : Boîte à moustaches contrôles positifs et négatifs de donneurs de sang normaux. Basis : contrôle négatif (n=98) ; STCON : contrôle AcM positif anti-FcεRI (n=98) ; fMLP : contrôle positif fMLP (n=61)

Code commande :

FK-CCR 100 tests

CE-marked product

CAST® est une marque déposée par BÜHLMANN dans de nombreux pays.



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

BÜHLMANN France SAS
France
info@buhlmannlabs.fr
www.buhlmannlabs.fr
Phone +33 3 89 66 91 14