



CAST[®]-2000 ELISA

Cellular Antigen Stimulation Test ELISA

EK-CAST 192 Tests
EK-CAST5 480 Tests

Revision date: 2010-01-05

INTENDED USE

The BÜHLMANN CAST®-2000 ELISA is intended for the quantitative determination of sulfidoleukotrienes (sLT) produced by isolated leukocytes upon contact with specific antigens. (The assay can also be used for allergen testing in horses. The protocol can be obtained upon request).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

In the CAST®-2000 ELISA (1), sedimented leukocytes from patient blood are simultaneously primed with Interleukin 3 (IL-3) and stimulated with allergens (2). Basophilic cells among others generate the allergic mediator, sulfidoleukotriene LTC₄, and its metabolites LTD₄ and LTE₄. *De novo* formation of LTC₄ can be both IgE dependent or non-IgE dependent. The latter event is usually described as pseudo-allergy (3). These freshly synthesized sLT are subsequently measured in an ELISA test (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). The principle of the CAST®-ELISA is covered by a patented technology (Patent No. US5487977).

The CAST®-2000 ELISA can be separated into three procedural parts:

1. ISOLATION OF LEUKOCYTES: Dextran is added to patient blood in order to increase the blood viscosity. After 90 minutes at 18-28°C, the erythrocytes are sedimented, whereas leukocytes and thrombocytes stay in the plasma fraction. Subsequently, the blood supernatant is being carefully transferred into separate tubes and the leukocytes are sedimented in a brief centrifugation step. The plasma supernatant containing >90% of the thrombocytes is discarded and the leukocyte pellet is resuspended in the Stimulation Buffer containing IL-3.

2. CELL STIMULATION: Each patient's cells are tested for the basal level release (= background) and for the release after stimulation with a specific allergen. The cells are stimulated during 40 minutes incubation at 37°C. Finally, the cells are centrifuged and the cell supernatant is either frozen for subsequent storage or immediately tested for sLT concentration in the ELISA.

As a positive control that proves the viability and functionality of the cells, a third blood sample of the patient is stimulated with an antibody (Ab) directed against the high affinity IgE receptor (FcεRI). Similar to an allergen, this antibody leads to the cross-linking of the Fcε receptor I and, therefore, to the stimulation of the cells. This anti-IgE receptor antibody binds to domain 1 on the α-subunit of the high affinity IgE receptor and is a non-inhibiting antibody. Thus, it will bind to the receptor irrespective of the receptor being free from or loaded with IgE.

3. LEUKOTRIENE DETERMINATION: The ELISA is performed using precoated microtiter plates. 16 wells per assay are used for the standard curve and controls. Two wells per patient are used for the background, two wells per patient for the stimulation control and two wells for each allergen. Enzyme Label (alkaline Phosphatase=aPase) and Antibody are added to the cell supernatants as well as to the standards and controls and incubated. After a washing step, Substrate Solution (para-Nitrophenyl-Phosphate = pNPP) is added to each well and incubated. Finally, Stop Solution (2N NaOH) is added to each well and the color absorbance is measured at 405 nm in a microtiter plate reader.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

REAGENTS FOR CELL ISOLATION AND CELL STIMULATION:

Reagents	Quantity		Code	Reconstitution
	EK-CAST	EK-CAST5		
Dextran Solution w/o preservatives	1 vial 20 ml	2 vials 20 ml	B-CAST-DS	Ready to use
Stimulation Buffer with IL3; w/o preservatives	1 vial lyoph.	3 vials lyoph.	B-CAST-STB	add 50 ml of <i>ultra-pure, apyrogenic water</i>
Stimulation Control anti-IgE Receptor Ab w/o preservatives	1 vial lyoph.	2 vials lyoph.	B-CAST-STCON	add 3.5 ml of <i>ultra-pure, apyrogenic water</i>

Table 1

ELISA REAGENTS:

Reagents	Quantity		Code	Reconstitution
	EK-CAST	EK-CAST5		
Microtiter Plate precoated with rabbit anti-mouse IgG	2 plates: 12 x 8	5 plates: 12 x 8	B-CAST-MP	Wash 1x before use
Plate Sealer	6 pieces	15 pieces		
Wash Buffer Concentrate (20X) With preservatives	1 bottle 50 ml	3 bottles 50ml	B-CAST-WB	Dilute with 950 ml of deionized water
ELISA Buffer With preservatives	1 bottle 30 ml	1 bottle 80 ml	B-CAST-EB B-CAST5-EB ¹⁾	Ready to use
Calibrator ²⁾ Leukotriene D ₄ in a HSA buffer matrix	5 x 1 lyoph.	8 x 1 vial lyoph.	B-CAST-CA ³⁾	Add 1 ml of deionized water
Control Low / High ⁴⁾ leukotriene D ₄ in a HSA buffer matrix	5 x 2 lyoph.	8 x 2 vials lyoph.	B-CAST-CONSET ⁵⁾	Add 1 ml of deionized water
Blanking Reagent ²⁾ Leukotriene D ₄ in a buffer matrix	1 vial lyoph.	1 vial lyoph.	B-CAST-BR	Add 2 ml of deionized water
Enzyme Label Leukotriene D ₄ conjugated to aPase with preservatives	2 vials lyoph.	3 vials lyoph.	B-CAST-ELS B-CAST-EL ¹⁾	Add 5.5 ml (B-CAST-EL: 11 ml) of ELISA Buffer
Antibody Mouse anti-sLT Ab in a buffer matrix with preservatives	1 vial 11 ml	1 vial 27.5 ml	B-CAST-AS B-CAST5-AS ¹⁾	Ready to use
pNPP Substrate with stabilizing pellets	1 vial 42 ml	1 vial 105 ml	B-CAST-PNPP B-CAST5-PNPP ¹⁾	Ready to use
Stop Solution 2 N NaOH	1 vial 11 ml	1 vial 27.5 ml	B-CAST-NAOH B-CAST5-NAOH ¹⁾	Ready to use <i>Corrosive agent</i>

Table 2

¹⁾ Order Code for EK-CAST5

²⁾ After reconstitution, the Calibrator contains 3200 pg/ml of LTD₄ and the Blanking Reagent contains 32'000 pg/ml of LTD₄, respectively.

³⁾ Single Calibrator Reagent Set: B-CAST-CA5 or -CA8 content: 5x or 8x B-CAST-CA.

⁴⁾ The Controls contain lot-specific amount of LTD₄. Refer to the QC data sheet added to the kit for actual concentrations.

⁵⁾ Single Control Reagent Set: B-CAST-CONSET5 or -CONSET8 content: 5x or 8x B-CAST-CONSET.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Kit	
Store at 2-8°C except Calibrators , Blanking Reagents and Controls which must be stored at -20°C or below. Do not use past kit expiration date.	
Opened / reconstituted reagents	
Dextran Solution	Store at 2-8°C until expiration date printed on the label
Stimulation Buffer	Stable at -20°C for 6 months. Aliquot if repeated use is expected
Stimulation Control	Stable at 2-8°C for 2 months. For longer storage aliquot and freeze at -20°C for up to 6 months.
Microtiter Plate	Remove the unused strips from the holder and make sure that every well is at least half way filled with storage buffer. Add Tris-Buffered Saline (TBS) if too much storage buffer is lost. Cover these extra strips with a plate sealer, return them to the foil pouch and reseal along the entire edge of zip-seal. Store for up

	to 6 months at 2-8°C.
Wash Buffer	Store for up to 2 months at 2-8°C
Calibrator	Do not store
Controls	

Blanking Reagent	Store at -20°C or below for up to 2 months. Aliquot if repeated use is expected
Enzyme Label	Store at 2-8°C for up to 2 months
ELISA Buffer	Store at 2-8°C until expiration date printed on the label
Antibody	
Substrate Solution	
Stop Solution	Store at 18-28°C or at 2-8°C until expiration date printed on the label

Table 3

ALLERGENS AND REAGENTS SUPPLIED UPON REQUEST

Reagents	Quantity	Code
Allergens ¹⁾ lyophilized or ready to dilute	1 vial	see CAST Allergen list (www.buhlmannlabs.ch)
C5a recombinant human C5a	1 vial	BAG2-C5A-R

Table 4

¹⁾ **Protein Allergens:** The BÜHLMANN protein allergens are quality controlled and shipped in liquid, concentrated form (1µl/vial). The protein allergens must be stored refrigerated and diluted before use.

Drug and Chemical Allergens: The BÜHLMANN low molecular weight allergens are shipped in lyophilized form. The low molecular weight allergens need to be stored refrigerated and must be reconstituted before use.

Refer to the BÜHLMANN Allergen Booklet and **Allergen Data Sheets** available on the BÜHLMANN webpage (www.buhlmannlabs.ch).

ALLERGEN REAGENTS FROM OTHER SOURCES

Allergens from other sources may be used in the CAST®-2000 ELISA with the following limitations:

- No matrix-bound allergens (solid or liquid phase).
- No allergen preparations containing leukotrienes.
- 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 AG.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Adjustable precision pipettes with disposable tips: 10-100 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml.
- Adjustable dispenser with disposable tips: 25-1000 µl.
- Disposable polypropylene tubes for the cell separation.
- Disposable polypropylene or polystyrene tubes and tissue culture grade microtiter plates for the cell stimulation, respectively.
- Laminar flow for cell separation and stimulation (optional).
- Refrigerated centrifuge at 130 - 1000 x g.
- *Ultrapure, apyrogenic water for the cell stimulation reagents.*
- Water bath (or incubator) set at 37°C.
- 50 ml and 1000 ml cylinder for the buffer preparation.
- Microtiter plate washing/aspiration device.
- Distilled or deionized water.
- Blotting paper.
- Microtiter plate rotator.
- Microtiter plate reader (405 nm).

WARNINGS AND PRECAUTIONS

REAGENTS CONTAINING HUMAN SOURCE MATERIAL: All components of the CAST-2000 kit with the exception of the Dextran Solution, pNPP Substrat and the Stop Solution

contain human serum albumin (HSA). Each serum donor unit used in the preparation of the kit components was tested by an FDA approved method and found negative for HBV, HCV and HIV antibodies. Although these methods are highly accurate, there is no guarantee that this material cannot transmit Hepatitis or AIDS. *Therefore, all patient specimens and kit components should be handled as if capable of transmitting infections.* All products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practice using appropriate precautions.

SUBSTRATE AND STOP SOLUTION: The Substrate Solution contains para-nitrophenyl-phosphate (pNPP). The Stop Solution contains 2N Sodium Hydroxide. Each of those reagents is irritant to eyes, skin and mucous membranes. Avoid contact with eyes, skin and clothing. Wear suitable protective clothing, gloves and eye protection. After contact with eyes or skin, wash immediately with plenty of water (*cf.* Material Safety Data Sheet).

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

It is recommended that patients should avoid systemically administered antiallergenic drugs such as **antihistamines, corticosteroids** or **chromoglycic acid** (DSCG) before sample collection. The time of avoidance depends on different factors, such as pharmacokinetic and bioavailability of substances, duration and regime of administration etc. In order to avoid any interaction with systemically administered drugs Bühlmann recommends to stop the administration, if possible, three to seven days before blood sample collection.

Patients supposed to suffer from drug hypersensitivity should not be tested for the drug immediately after an adverse reaction. A recovery phase of several weeks after the adverse reaction is recommended. Different studies propose to find the highest sensitivity of the assay by testing the patient within about half a year after the adverse reaction to drugs.

Important: Blood samples from patients going to be tested *in vivo* like skin test or oral provocation, must be drawn before any exposure to the allergen happens.

Collect sufficient blood into EDTA venipuncture tubes. 200 µl of whole blood are needed per reaction tube. Determine the minimum amount of blood needed according to the following table:

No. of allergens to be tested	Required blood (ml)
1-5	2.0
6-10	3.0
11-15	4.0
16-20	5.0

Table 5

IMPORTANT:

- Perform the cell stimulation **within 24 hours** after blood collection.
- Blood sample should be refrigerated **at 2-8°C**.
- Do not centrifuge or freeze the blood.

PROCEDURAL NOTES

RECOMMENDED WATER QUALITY FOR THE CAST®-2000:
Cell stimulation: The use of *ultrapure, apyrogenic water* for reconstituting cell stimulation reagents (Stimulation Buffer and Stimulation Control) is essential for good and reproducible leukocyte stimulation. The following sources of water may be used: Cell culture grade water, infusion grade water or deionized double distilled water that is ultrafiltrated in a periodically sanitized 10 kDa ultrafilter.

ELISA: All reagents must be reconstituted with deionized or 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 or a falsely positive stimulation. Therefore, care must be taken to cover blood samples and cell stimulation tubes. Avoid dust mites, pollinating plants and open windows in the laboratory where the cell stimulation is performed. *We recommend to carry out the cell preparation and stimulation steps in a laminar flow hood.*

CALIBRATOR DILUTION

*Reconstitute a new calibrator vial and prepare a fresh standard curve each time a new assay is performed. Reconstituted and diluted **Calibrators** and **Controls** are **not stable** and must be used in the ELISA without delay.*

In order to obtain an entire standard curve, serial dilutions of the Calibrator are prepared as follows:

- Label three tubes S2 through S4 and pipet 300 µl of ELISA Buffer into tubes S2 through S4.
- Pipet 100 µl of reconstituted Calibrator (S1, 3200 pg/ml) into tube S2 and vortex.
- Transfer 100 µl from S2 to S3, vortex. Transfer 100 µl from S3 to S4, vortex.

The corresponding sLT concentrations will be:

S1:	3200 pg/ml	S4:	50 pg/ml
S2:	800 pg/ml	S0:	Zero calibrator
S3:	200 pg/ml		(ELISA Buffer only)

ASSAY PROCEDURE

CELL STIMULATION

The reagent volumes in steps 1. to 4. depend on the sample volume and must be determined according to the table below:

Volume Table for the Cell Stimulation Reagents		
Blood Sample	Dextran Solution	Stimulation Buffer
1 ml	0.25 ml	1 ml
2 ml	0.50 ml	2 ml
3 ml	0.75 ml	3 ml

Table 6

The volumes in steps 1. to 8. are calculated from 2 ml blood sample volume from a single patient tested for a single allergen as an example:

1. Pipet 2 ml of blood into a polypropylene tube, add 0.5 ml of Dextran Solution and vortex gently at low speed.
2. Incubate for 90 minutes at 18-28°C.
3. Transfer the upper phase into a second tube and centrifuge it for 15 minutes at 130 x g and 18-28°C.
4. Discard the supernatant and resuspend the cells in 2 ml of Stimulation Buffer. *Proceed to step 5 without interruption.*

Notes: The incubation in step 5. may be carried out in small polypropylene or polystyrene tubes and in non-activated polystyrene microtiter plates, respectively. *The following procedure uses polypropylene tubes in step 5. as an example.* If sufficient cell suspension from step 4. is available, the volumes in step 5. may be doubled. This allows aliquoting and freezing of the supernatants for eventually assaying the samples a second time.

- 5a. Label tubes for each patient: PB (patient background), PC (patient control), A1 (allergen 1), and so on.
- 5b. Pipet 50 µl of *Stimulation Buffer (background)* into the PB tube of each patient.
- 5c. Pipet 50 µl of *Stimulation Control* into the PC tube of each patient.
- 5d. Pipet 50 µl of *Allergen* into the corresponding patient tubes.
6. Pipet 200 µl of each patient's cell suspension into the corresponding tubes.
7. Vortex gently, cover the tubes and incubate in a water bath for 40 minutes at 37°C.
8. Vortex to dissolve agglutinates. Centrifuge for 3 minutes at 1000 x g and 2-8°C. Refrigeration is recommended for obtaining a firm pellet and to prevent sLT degradation. Pipet carefully 2 x 100 µl of cell supernatant from each tube for use in step 3e. of the ELISA procedure.

Important: Proceed immediately to the ELISA procedure or store the cell supernatants for up to 4 months at ≤20°C.

ELISA PROCEDURE

1. Determine the number of capture antibody-coated microtiter plate strips required to test the desired number of patients and allergens plus 16 wells needed for running Blanking Reagent, Calibrator and Controls.

If you do not use all of the strips at once, remove the remaining strips from the holder and make sure that every well is at least half way filled with Storage Buffer. Add Tris-Buffered Saline solution (TBS) if too much storage buffer is lost. Cover extra strips with the Plate Sealer and store refrigerated.

2. Empty the coated wells filled with Storage Buffer. Wash the wells once using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
 - 3a. Pipet 100 µl of Blanking Reagent in duplicate into wells A1+A2.
 - 3b. Pipet 100 µl of ELISA Buffer (Zero Calibrator, S0) in duplicate into wells B1+B2.
 - 3c. Pipet 100 µl of Calibrator S4 (50 pg/ml) in duplicate into wells C1+C2.

Pipet 100 µl of Calibrator S3 (200 pg/ml) in duplicate into wells D1+D2.

Pipet 100 µl of Calibrator S2 (800 pg/ml) in duplicate into wells E1+E2.

Pipet 100 µl of Calibrator S1 (3200 pg/ml) in duplicate into wells F1+F2.
 - 3d. Pipet 100 µl of the Low Control in duplicate into wells G1+G2.

Pipet 100 µl of the High Control in duplicate into wells H1+H2.
 - 3e. Pipet 100 µl of each cell supernatant in duplicate into the subsequent wells.
4. Add 50 µl of Enzyme Label to all wells.

- Add 50 µl of Antibody to all wells.
- Cover the plate with a Plate Sealer, place the plate on a plate rotator set at 800-1000 rpm and incubate for 2 hours at 18-28°C.

Note: Alternatively, incubate the plate for 16-20 hours at 2-8°C

- Remove the Plate Sealer. Empty the wells and wash them three times using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Strike the plate firmly onto blotting paper.

Important: Allow the pNPP Substrate Solution to come to 18-28°C prior to use.

- Add 200 µl of pNPP Substrate Solution to all wells.
- Cover the plate with a Plate Sealer, place the plate on a plate rotator set at 800-1000 rpm, protect the plate from direct light and incubate for 30 minutes at 18-28°C.
- Remove the plate sealer. Stop the reaction by adding 50 µl of Stop Solution to all wells. Mix shortly on the microtiter plate rotator.
- Read the absorbance at 405 nm in a microtiter plate reader within 30 minutes.

CALCULATION OF RESULTS

GLOSSARY

Maximum Binding (MB, S₀): Technical maximum absorption of the ELISA used for the calculation of the corresponding percent bound (B/B₀) values.

Blank (NSB): Technical, non-specific absorption of the ELISA. The value is subtracted from Calibrator, Control and sample absorptions.

STANDARD CURVE

Record the absorbance at 405 nm for each Calibrator, maximum binding (MB = S₀) and blank (NSB) well.

Average the duplicate values, subtract the average of the blank wells (NSB) and record the averages (= corrected average absorbance).

Calculate the binding of each pair of Calibrator wells as a percent of maximum binding, with the NSB-corrected MB absorbance taken as 100%:

$$B/B_0 (\%) = \text{percent bound} = \frac{\text{net absorbance}}{\text{net MB absorbance}} \times 100$$

Plot the percent bound (vertical axis) versus the sLT concentration in picograms/ml (pg/ml) of the calibrators (horizontal axis) using a lin/log graph paper. Draw the best fitting curve or calculate the standard curve using a four parameter algorithm.

SAMPLES AND CONTROLS

Record the absorbance at 405 nm for each sample and control well.

Average the duplicate values, subtract the average of the blank wells and record the averages (= corrected average absorbance).

Calculate, as described above, the binding of each pair of sample and control wells as a percent of maximum binding, with the NSB-corrected MB absorbance taken as 100%.

Read the sLT concentration (pg/ml) from the horizontal axis by interpolation of the B/B₀ value of the samples and controls.

NOTE: If the of an unknown sample is greater than the highest Calibrator, the cell supernatant should be diluted with ELISA Buffer and assayed again according to the assay procedure. The additional dilution must be

considered when calculating the final concentration of sLT present in the unknown sample.

STIMULATION YIELD

Yield of Stimulation Control = sLT concentration (Stimulation Control) - sLT concentration (Background)

Yield of Allergen Stimulation = sLT concentration (Allergen Stimulation) - sLT concentration (Background)

For an Example of typical Results see Table 31 and Figure 1. The results and standard curve are provided for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.

ASSAY QUALITY CONTROL

In order to verify an accurate test performance, it is imperative to keep track of the following quality control parameters:

- OD reading of the assay blank: < 200 mOD
- Estimated dose at 50% binding (ED-50): 200-400 pg/ml sLT
- Level of patient background: < 200 pg/ml sLTs release
- Level of Stimulation Control: > 200 pg/ml sLTs release (after subtraction of the background).

INTERPRETATION OF RESULTS

INTERPRETATION OF STIMULATION CONTROL

In allergic as well as in non-allergic individuals, a net stimulation control yield (after subtraction of background) of at least 200 pg/ml should be expected using the Stimulation Control. The Stimulation Control represents leukotrienes production due to cross-linking of high affinity IgE receptors (FcεRI) on basophils by an anti-IgE receptor antibody. The Stimulation Control may be correlated to the FcεRI density on the patient basophils and the releasability of patient's basophils.

INTERPRETATION OF ALLERGEN STIMULATION

For **INHALATION** and **FOOD ALLERGENS** as well as for **LATEX** and **α-AMYLASE**, we propose that individuals with a net stimulation yield **HIGHER THAN 200 pg/ml sLT** should be regarded as positive for the allergen tested.

In a recent study (4) the clinical cut-off for **BEE** (BAG2-I1) and **WASP VENOM** (BAG2-I3) was set to **270 pg/ml** with a grey zone from 200 to 270 pg/ml.

Due to the small increase of sLT release with **DRUG ALLERGENS**, **CHEMICAL ALLERGENS** and **FOOD ADDITIVES** Bühlmann established for each single allergen an **INDIVIDUAL TECHNICAL CUT-OFF**. The values represent the mean + 3SD of net stimulation from up to 20 stimulated samples from normal blood donors. Due to inter-laboratory variation and the precision of the assay the cut-off values are not below 40 pg/ml. The technical cut-offs are listed in the allergen data sheet (refer to chapter ALLERGENS AND REAGENTS SUPPLIED UPON REQUEST).

Notes:

- Bühlmann recommends using a grey zone including ±20% of the individual technical cut-offs.
- To use the individual technical cut-off the assay quality control criteria of the EK-CAST must be fulfilled.
- These values should be used as guidelines only. A clinical relevant cut-off should be established by each laboratory and by further studies, respectively.

QUALITY CONTROL

A thorough understanding of this package insert is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by using precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and accurately following this package insert.

Since there are no controls for sLT commercially available, we recommend using pools of cell supernatants containing different sLT levels for internal quality controls (cell supernatants are stable for up to two months at $\leq -20^{\circ}\text{C}$). All controls should fall within established confidence limits. The confidence limits for the BÜHLMANN synthetic sLT controls are lot-specific and printed on the additional QC Data Sheet.

The reproducibility of standard curve parameters and control values should be within established limits of laboratory acceptability. If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices ii) settings of the ELISA reader iii) expiration dates of reagents iv) storage and incubation conditions v) pNPP Substrate Solution should be colorless vi) purity of water.

(stimulated with Stimulation Buffer only) shows the releasability of the patient's basophils. The background concentration determined in 100 blood donors from the Swiss Red Cross Center, Basle, was 20-140 pg/ml (2.5-97.5% percentile) and a net stimulation (positive control) of 396- >3200 pg/ml sLT (cf. Table 38). However, patients exposed to the allergen *in vivo* or atopic patients, particularly patients sensitive to latex, may exhibit much higher background sLT values. Nevertheless, a significant difference between stimulated (stimulation control) and non-stimulated samples (negative control) was still observed in most cases of allergic patients.

LIMITATIONS

A negative CAST[®]-2000 ELISA result for a specific allergen can not exclude the potential occurrence of a (even severe) clinical reaction in a patient. Patients with a history of adverse reactions to a drug allergen with a negative CAST[®]-2000 ELISA result should therefore be followed up with an additional method, such as an *in vivo* provocation or skin prick test (where appropriate), before any drug is administered.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

KINETICS OF CELL STIMULATION: An example of the kinetics of sLT production is given in Figure 2. The kinetics may differ from one individual to another. However, a stable stimulation is reached after 40 minutes of incubation.

INTRA-ASSAY PRECISION OF THE ELISA (WITHIN-RUN): 4.6%. The intra-assay precision was calculated from the results of 24 pairs of values from each sample in a single run. The values are presented in pg/ml of sLT (Table 32).

INTRA-ASSAY PRECISION OF CELL STIMULATION AND ELISA COMBINED: 11.3%. The statistics were calculated from the results of 10 replicates of cell stimulation from each sample in a single run. The values are presented as pg/ml of sLT (Table 33).

INTER-ASSAY PRECISION OF THE ELISA (RUN-TO-RUN): 15.4%. The inter-assay precision was calculated for each sample from the results of 20 pairs of values in 20 different runs. The values are presented as pg/ml of sLT (Table 34).

ANALYTICAL SENSITIVITY OF THE ELISA: 19 pg/ml. The minimal detectable dose of sLT was calculated to be 19 pg/ml by subtracting two SD from the mean of 20 zero Calibrator replicates (ELISA Buffer, S0) and intersecting this value with the standard curve obtained in the same run.

DILUTION LINEARITY: 114.6%. Three patient samples after cell stimulation were assayed either undiluted or diluted with the ELISA Buffer. The values are presented in pg/ml of sLT (Table 35).

SPIKING RECOVERY: 99.5%. Three unstimulated patient samples were assayed before and after spiking with varying amounts of sLT D₄. The values are presented in pg/ml of sLT (Table 36).

SPECIFICITY: Crossreactivities of the monoclonal antibody used were determined at 50% binding (Table 37 **Specificity**).

EXPECTED VALUES

The difference of the sLT concentration in the sample stimulated by allergen compared to the background sample

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN CAST®-2000 ELISA wird gebraucht für die quantitative Bestimmung von Sulfidoleukotrien (LTC₄, LTD₄, LTE₄) welche von isolierten Leukozyten nach Allergen-(Antigen-)Kontakt synthetisiert und ausgeschüttet werden. (Der Assay kann auch als Leukozytenstimulationstest bei Pferden eingesetzt werden. Das entsprechende Protokoll wird auf Anfrage zur Verfügung gestellt).

PRINZIP DER METHODE

Im CAST®-2000 ELISA (1) werden sedimentierte Leukozyten aus Patienten Blutproben gleichzeitig mit Interleukin 3 (IL-3) behandelt (Priming) und mit Allergenen stimuliert (2). Vorwiegend basophile Zellen synthetisieren den Allergie-Mediator Leukotrien LTC₄ und setzen ihn zusammen mit seinen Metaboliten LTD₄ und LTE₄ frei. Bei allergischen Typ I-Reaktionen ist die *de novo* Synthese von LTC₄ IgE-vermittelt, während bei den sog. Pseudo-Allergien andere, IgE unabhängige Vorgänge eine Rolle spielen (3). Im Anschluss an die Stimulation werden die freigesetzten Leukotriene in einem ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) quantifiziert. Das CAST®-2000 ELISA-Prinzip ist patentrechtlich (Nr.: US5,487,977) geschützt.

Es können beim CAST-2000 drei Testabschnitte unterschieden werden:

ISOLATION DER LEUKOZYTEN: Durch Zugabe von Dextran zu den Patientenproben wird die Viskosität des Blutes erhöht, wodurch sich die Erythrozyten bei der anschliessenden 90-minütigen Sedimentation absetzen, während Leukozyten und Thrombozyten in der Plasma-Fraktion verbleiben. Diese Plasma-Fraktion wird vorsichtig in frische Teströhrchen überführt, wo die Leukozyten nach einer kurzen Zentrifugation isoliert werden. Nach der Zentrifugation finden sich die Leukozyten im Niederschlag. Der Überstand enthält mehr als 90 % der Thrombozyten und wird verworfen. Die isolierten Leukozyten werden anschliessend in IL-3-haltigem Stimulationspuffer resuspendiert.

STIMULATION DER LEUKOZYTEN: Die resuspendierten Leukozyten werden als Zellsuspension zur weiteren Stimulation wie folgt behandelt. Durch Zugabe des entsprechenden Allergens bzw. Antigens werden die Zellen stimuliert und so zur *de novo* Synthese von Leukotrien angeregt, die in den Zellüberstand abgegeben werden. Daneben wird für jede Probe eine basale Stimulation (Background) sowie zur Beurteilung der Vitalität der Zellen eine Stimulationskontrolle mit einem Anti-IgE-Rezeptor (FcεRI) Antikörper durchgeführt. Nach der 40-minütigen Stimulation bei 37°C wird aus den Stimulationsüberständen im nachfolgenden Enzymimmunoassay die Menge der synthetisierten und freigesetzten Leukotriene bestimmt.

LEUKOTRIENBESTIMMUNG: Der ELISA-Test wird in beschichteten Mikrotiter-Platten durchgeführt. 16 Mikroküvetten pro Ansatz werden für die Standards und Kontrollen gebraucht. Je 2 Mikroküvetten pro Patient werden für die basale Stimulation und die Stimulationskontrolle gebraucht. Standards, Stimulations-Überstände der Patientenproben und Kontrollen werden zusammen mit enzymmarkiertem (alkalische Phosphatase = aPase) Leukotrien D₄ und spezifischen anti-sLT Antikörpern in der Mikrotiter-Platte inkubiert. Ungebundene Reaktionspartner werden in einem anschliessenden Waschschritt entfernt.

Zugegebenes Substrat, p-Nitrophenylphosphat (pNPP), wird anschliessend vom gebundenen Enzym zu einem farbigen Endprodukt umgesetzt. Die Reaktion wird nach 30 Minuten durch Zugabe der Stop-Lösung beendet und die Absorption in einem Mikrotiter-Platten-Photometer bei 405 nm gemessen.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

REAGENZIEN FÜR DIE ZELLENISOLATION UND STIMULATION

Reagenzien	Inhalt		Art.-Nr.	Rekonstitution
	EK-CAST	EK-CAST5		
Dextran-Lösung ohne Konservierungsstoffe	1 Fl. 20 ml	2 Fl. 20 ml	B-CAST-DS	gebrauchsfertig
Stimulationspuffer mit IL3; ohne Konservierungsstoffe	1 Fl. lyoph.	3 Fl. lyoph.	B-CAST-STB	mit 50 ml ultrapurem, pyrogen-freiem H ₂ O lösen
Stimulationskontrolle anti-IgE Rezeptor Ak ohne Konservierungsstoffe	1 Fl. lyoph.	2 Fl. lyoph.	B-CAST-STCON	mit 3.5 ml ultrapurem, pyrogen-freiem H ₂ O lösen

Table 7

ELISA REAGENZIEN

Reagenzien	Inhalt		Art.-Nr.	Rekonstitution
	EK-CAST	EK-CAST5		
Mikrotiter-Platte Kaninchen anti-Maus IgG beschichtete Platten	2 Stk: 12 x 8	5 Stk: 12 x 8	B-CAST-MP	vor Gebrauch einmal waschen.
Platten-Abdeckfolie	6 Stück	15 Stück		
Waschpuffer-Konzentrat (20X) mit Konservierungsstoffen	1 Fl. 50 ml	3 Fl. 50ml	B-CAST-WB	mit 950 ml deionisiertem H ₂ O lösen
ELISA-Puffer mit Konservierungsstoffen	1 Fl. 30 ml	1 Fl. 80 ml	B-CAST-EB B-CAST5-EB ¹⁾	gebrauchsfertig
Kalibrator²⁾ LTD ₄ in HSA Puffer Matrix	5 x 1 Fl. lyoph.	8 x 1 Fl. lyoph.	B-CAST-CA ³⁾	mit 1 ml deionisiertem H ₂ O lösen
Kontrollen tief/hoch⁴⁾ LTD ₄ in HSA Puffer Matrix	5 x 2 Fl. lyoph.	8 x 2 Fl. lyoph.	B-CAST-CONSET ⁵⁾	mit 1 ml deionisiertem H ₂ O lösen
Nullwert-Reagenz²⁾ gepuffertes LTD ₄	1 Fl. lyoph.	1 Fl. lyoph.	B-CAST-BR	mit 2 ml deionisiertem H ₂ O lösen
Enzym-Marker aPase konjugiertes LTD ₄ mit Konservierungsstoffen	2 Fl. lyoph.	3 Fl. lyoph.	B-CAST-ELS B-CAST-EL ¹⁾	mit 5.5 ml (B-CAST-EL: 11 ml) ELISA-Puffer lösen
Antikörper gepuffertes Maus anti-sLT Ak mit Konservierungsstoffen	1 Fl. 11 ml	1 Fl. 27.5 ml	B-CAST-AS B-CAST5-AS ¹⁾	gebrauchsfertig

Table 8

pNPP Substrat mit stabilisierenden Pellets	1 Fl. 42 ml	1 Fl. 105 ml	B-CAST-PNPP B-CAST5-PNPP ¹⁾	gebrauchsfertig
Stopp-Lösung 2 N NaOH	1 Fl. 11 ml	1 Fl. 27.5 ml	B-CAST-NAOH B-CAST5-NAOH ¹⁾	gebrauchsfertig korrosiv!

¹⁾ Reagenzien Art.-Nr für EK-CAST5

²⁾ Nach der Rekonstitution enthält der Standard 3200 pg/ml LTD₄ und das Blank-Reagenz 32'000 pg/ml LTD₄.

³⁾ Einzelnes Kalibratoren Reagenzienset: B-CAST-CA5 oder -CA8; Inhalt: 5x oder 8x B-CAST-CA

⁴⁾ Die Kontrollen enthalten eine Lot-abhängige Menge LTD₄. Siehe zusätzliches QC Datenblatt für die genauen Konzentrationen.

⁵⁾ Einzelnes Kontroll-Reagenzienset: B-CAST-CONSET5 oder -CONSET8; Inhalt: 5x oder 8x B-CAST-CONSET

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Bei 2-8°C Lagern, ausser Kalibratoren , Nullwert-Reagenz und Kontrollen bei -20°C . Zu verwenden bis zum Verfallsdatum.	
Geöffnete / rekonstituierte Reagenzien	
Dextran-Lösung	Bei 2-8°C lagern. Zu verwenden bis Verfallsdatum.

Stimulations-Puffer	6 Monate bei -20°C haltbar. Für wiederholten Gebrauch aliquotieren.
Stimulations-Kontrolle	2 Monate bei 2-8°C stabil. Für längere Lagerung aliquotieren und bei -20°C bis 6 Monate haltbar.
Mikrotiter-Platten	Ungebrauchte Streifen vom Halter entfernen und sicherstellen, dass alle Mikroküvetten mindestens bis auf die Hälfte mit Lagerungs-Puffer gefüllt sind. Tris-gepufferte Salz-Lösung (TBS) zugeben, falls zuviel Lagerungs-Puffer verloren gegangen ist. Die zusätzlichen Streifen mit einer Abdeckfolie bedecken, in die Lager-Tasche zurückstellen und diese gut schliessen. Bei 2-8°C lagern. Zu verwenden bis 6 Monate nach dem Öffnen.
Waschpuffer	Bei 2-8°C lagern. Zu verwenden bis 2 Monate nach Rekonstitution.
Kalibrator Kontrollen	Nicht lagerfähig
Nullwert-Reagenz	Bei -20°C oder tiefer lagern. Zu verwenden bis 2 Monate nach Rekonstitution. Für wiederholten Gebrauch aliquotieren
Enzym-Marker	Bei 2-8°C lagern. Zu verwenden bis 2 Monate nach Rekonstitution.
ELISA-Puffer	
Antikörper	Bei 2-8°C lagern. Zu verwenden bis zum Verfallsdatum.
pNPP-Substrat	
Stopp-Lösung	Bei 18-28°C oder 2-8°C lagern. Zu verwenden bis zum Verfallsdatum.

Table 9

ALLERGENE UND REAGENZIEN AUF ANFRAGE

Reagenz	Menge	Art.-Nr.
Allergene ¹⁾ lyophilisiert oder zu verdünnen	1 Flasche	Siehe CAST Allergen Liste (www.buhlmannlabs.ch)
C5a rekombinantes human C5a	1 Flasche	BAG2-C5A-R

Table 10

¹⁾ **Proteinallergene:** Die BÜHLMANN Proteinallergene wurden bezüglich der Qualität kontrolliert und werden in flüssiger, konzentrierter Form (1µl/Röhrchen) versandt. Die Proteinallergene müssen gekühlt gelagert werden und werden vor Gebrauch verdünnt.

Medikamenten- und Chemikalienallergene: Die niedermolekularen Allergene von BÜHLMANN werden in lyophilisierter Form versandt. Diese Allergene müssen gekühlt gelagert und vor Gebrauch rekonstituiert werden.

Weitere Infos, siehe BÜHLMANN Allergen-Broschüre und **Allergendatenblätter**, welche auf der BÜHLMANN Internetseite (www.buhlmannlabs.ch) zu finden sind.

ALLERGENE ANDERER HERKUNFT

Allergene anderer Herkunft können im CAST[®]-2000 ELISA unter Berücksichtigung der folgenden Limitierungen verwendet werden:

- Keine Matrix-gebundene Allergene (fest oder flüssig).
- Keine Allergen-Präparationen mit sLT.
- 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

- Verstellbare Präzisionspipetten mit Pyrogen-freien Einwegspitzen für 10-100 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml.
- Dispenser Pipette für 25-1000 µl.
- Polypropylen Einwegröhrchen zur Zellisolation.
- Polystyren oder Polypropylen Einwegröhrchen oder Zellkultur-Mikrotiter-Platte zur Zellstimulation.
- „Laminar Flow“ zur Zellisolation und Stimulation (optional).
- gekühlte Zentrifuge zur Zentrifugation bei 130 - 1000 x g.

- Ultrareines und Pyrogen-freies Wasser zum lösen der Zellstimulationsreagenzien.
- Wasserbad (oder Inkubator), auf 37°C eingestellt.
- 50 ml und 1000 ml Zylinder zur Puffervorbereitung.
- Mikrotiter-Platten-Waschgerät.
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser.
- Saugfähiges Papier.
- Mikrotiter-Platten-Schüttler.
- Mikrotiter-Platten-Photometer (405 nm).

WARNUNG UND VORSICHTSMAßNAHMEN

REAGENZIEN MIT HUMAN MATERIAL

Mit der Ausnahme der Dextran-Lösung, dem pNPP Substrat und der Stopp-Lösung enthalten alle Reagenzien des CAST-2000 Kits humanes Serum Albumin (HSA). Jedes einzelne Spenderserum wurde durch eine FDA genehmigte Methode auf HBV Oberflächen Antigen-, HCV- und HIV1/2-Antikörper getestet, und als negativ freigegeben. Trotz hoher Genauigkeit dieser Methoden kann keine Garantie gewährleistet werden, dass die Reagenzien nicht Hepatitis oder AIDS übertragen können. *Aus diesem Grunde müssen die Kitkomponenten, sowie die Patientenproben als potentiell infektiös betrachtet werden.* Alle Produkte welche humanes Material enthalten, müssen mit größter Vorsicht und nach den Vorgaben der Guten Labor Praxis (GLP) verarbeitet werden.

SUBSTRAT- UND STOPPLÖSUNG

pNPP Substrat enthält *para*-Nitrophenylphosphat. Die Stopp-Lösung enthält 2N Natriumhydroxid (NaOH). Beide Reagenzien reizen die Augen, die Haut und die Schleimhäute. Berührung mit den Augen, der Haut und der Bekleidung vermeiden. Entsprechende Schutzbekleidung tragen (Schutzbrillen, Handschuhe und Labormantel). Nach Berührung, sofort mit viel Wasser spülen.

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Vor der Blutabnahme sollten Patienten alle systemisch eingenommenen antiallergischen Medikamente, wie Antihistaminika Korticosteroide, oder Chromoglycinsäure (DSCG) vermeiden. Der Zeitraum der Vermeidung hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit der Substanzen, Dauer und Art der Verabreichung usw. Um mögliche Interaktionen mit systemisch verabreichten Medikamenten zu vermeiden, empfiehlt Bühlmann, als allgemeinen Hinweis und wenn möglich, während drei bis sieben Tagen vor der Blutentnahme die Einnahme der Medikamente abzusetzen.

Patienten mit einer vermuteten Medikamenten Überempfindlichkeit sollten nicht unmittelbar nach dem Ereignis darauf getestet werden. Eine Erholungsphase von mehreren Wochen nach dem Ereignis wird empfohlen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die höchste Sensitivität des Tests erreicht werden kann, wenn innerhalb eines halben Jahres nach dem Ereignis der Patient getestet wird.

Wichtig: Die Blutentnahme bei Patienten welche gleichzeitig in vivo getestet werden sollen (Hauttest oder oraler Provokationstest) muss unbedingt vor der Allergenexposition erfolgen.

Ausreichende Blutmenge in EDTA-Röhrchen sammeln. Pro Reaktionsröhrchen werden 200 µl Vollblut benötigt. Die minimale, benötigte Blutmenge mit der folgenden Tabelle bestimmen:

Anzahl zu testende Allergene	Benötigte Blutmenge (ml)
1-5	2.0
6-10	3.0
11-15	4.0
16-20	5.0

Table 11

WICHTIG:

- Die Zellstimulation muss **innerhalb von 24 Stunden** nach der Blutentnahme durchgeführt werden.
- Die Blutproben müssen **bei 2-8°C** aufbewahrt werden.
- Blutproben nicht zentrifugieren oder einfrieren.

TECHNISCHE HINWEISE

EMPFOHLENE WASSERQUALITÄT FÜR DEN CAST®-2000

Zellstimulation: Um eine gute und reproduzierbare Leukozytenstimulation zu gewährleisten, ist ausschliesslich ultrareines, pyrogen-freies Wasser zur Rekonstitution der Zellstimulations-Reagenzien (Stimulations-Puffer und -Kontrolle) zu verwenden. Die folgenden Wasserqualitäten dürfen gebraucht werden: Wasser für Zellkulturen, für Infusionen oder deionisiertes, doppel-destilliertes Wasser, das durch regelmässig kontrollierte 10 kDa Ultrafilter filtriert wurde.

ELISA: Alle Reagenzien müssen mit deionisiertem, doppel-destilliertem Wasser oder mit Wasser rekonstituiert werden, welches für die Zellstimulation verwendet wird.

VERMEIDUNG VON KONTAMINATION WÄHREND DER ZELL-STIMULATION

In der Raumluft enthaltene Aeroallergene können in der Bearbeitung befindliche Allergenextrakte und/oder Patientenproben unbeabsichtigt kontaminieren und so zu einem erhöhten Wert in der basal Stimulation (Background) führen. Alle verwendeten Proberöhrchen 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 Antigenquellen zu berücksichtigen. Durchführung der Zellpräparation und Stimulation unter einem „Laminar Flow“ wird empfohlen.

VERDÜNNUNG DES KALIBRATORS

Für jeden neuen Testansatz jeweils nur einen „Master“-Kalibrator rekonstituieren und eine neue Eichkurve bestimmen. Rekonstituierte sowie verdünnte **Kalibratoren und Kontrollen sind nicht haltbar und müssen unmittelbar gebraucht werden.** Um eine vollständige Eichkurve zu erhalten, wird die Verdünnungsreihe wie folgt vorbereitet:

- Drei Röhrchen von S2 bis S4 beschriften und 300 µl ELISA-Puffer in die jeweiligen Röhrchen (von S2 bis S4) pipettieren.
- 100 µl rekonstituierter Kalibrator (S1, 3200 pg/ml) ins Röhrchen S2 pipettieren und mischen (Vortex).
- 100 µl von S2 nach S3 transferieren und mischen (Vortex). Danach, 100 µl von S3 nach S4 transferieren und mischen (Vortex).

Die entsprechenden Konzentrationen sind:

S1: 3200 pg/ml	S4: 50 pg/ml
S2: 800 pg/ml	S0: Nullkalibrator
S3: 200 pg/ml	(nur ELISA-Puffer)

ZELLSTIMULATION

Das Reagenzvolumen in den Schritten 1 bis 4 hängt vom eingesetzten Probenvolumen ab und muss gemäss folgender Tabelle ermittelt werden:

Volumentabelle für die Zell-Stimulations Reagenzien		
Blutprobe	Dextran-Lösung	Stimulations-Puffer
1 ml	0.25 ml	1 ml
2 ml	0.50 ml	2 ml
3 ml	0.75 ml	3 ml

Table 12

Als Beispiel wurden die Volumen in den Schritten 1 bis 8 aus einer 2 ml Blutprobe von einem Patienten für ein Allergen errechnet:

1. 2 ml Blut in ein Polypropylen-Röhrchen pipettieren, 0.5 ml Dextran-Lösung zugeben und leicht mischen (Vortex bei tiefer Geschwindigkeit).
2. 90 Minuten bei 18-28°C inkubieren.
3. Obere Phase in ein zweites Röhrchen transferieren und 15 Minuten bei 130 x g und 18-28°C zentrifugieren.
4. Überstand verwerfen und Zellen mit 2 ml Stimulations-Puffer resuspendieren. *Ohne Unterbruch mit Schritt 5 fortfahren.*

Hinweis: Die nachfolgende Inkubation kann entweder in kleinen Polypropylen- oder Polystyren-Röhrchen oder in nicht-aktivierten Mikrotiter-Platten durchgeführt werden. *Die nachfolgende Anleitung benutzt Polypropylen-Röhrchen in Schritt 5 als Beispiel.* Falls eine ausreichende Zell-Suspension aus Schritt 4 erhalten wurde, können Volumen in Schritt 5 verdoppelt werden. Dies erlaubt Aliquotierung und Einfrieren der Überstände für eine Wiederholung der Messungen.

- 5a. Für jeden Patienten Röhrchen beschriften: PB (Patient-Basalwert), PC (Patient-Kontrolle), A1 (Allergen 1), usw.
- 5b. 50 µl Stimulationspuffer (Background) in die jeweiligen PB-Röhrchen pipettieren.
- 5c. 50 µl Stimulations-Kontrolle in das PC-Röhrchen pipettieren.
- 5d. 50 µl Allergen in das entsprechende Röhrchen pipettieren.
6. 200 µl Patienten-Zellsuspension in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
7. Leicht mischen (Vortex), Röhrchen bedecken und 40 Minuten bei 37°C inkubieren.
8. Vortexen, um Aggregate aufzulösen. 3 Minuten bei 1000 x g und 2-8°C zentrifugieren. Die Abkühlung wird empfohlen, um einen festen Niederschlag zu erhalten und zur Vermeidung einer möglichen sLT Degradation. 2x 100 µl Zellüberstand aus jedem Röhrchen für den Schritt 3e. der ELISA Anleitung pipettieren.

Wichtig: ELISA sofort durchführen oder Überstände bei ≤-20°C lagern. Diese sind bis 4 Monate stabil

ELISA-ANLEITUNG

1. Eine ausreichende Anzahl Streifen zum Ansatz von Nullwert-Reagenz, Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmung vorbereiten.

Falls nicht alle Streifen im gleichen Ansatz gebraucht werden, die restlichen in den Streifenhalter zurücklegen. Die Mikroküvetten müssen bis zum Hälfte mit Lagerungs-Puffer gefüllt sein, falls dies nicht der Fall ist, mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) auffüllen. Die Streifen mit einer Abdeckfolie zudecken und kühl lagern.

2. Mikroküvetten entleeren und je einmal mit mindestens 300 µl Waschpuffer waschen. Küvetten entleeren und Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
- 3a. 100 µl Nullwert-Reagenz, im Doppelansatz in die Mikroküvetten A1 und A2 pipettieren.
- 3b. 100 µl ELISA-Puffer (Nullstandard, S0), im Doppelansatz in die Mikroküvetten B1 und B2.
- 3c. 100 µl Kalibrator S4 (50 pg/ml), im Doppelansatz, in die Mikroküvetten C1 und C2.
 100 µl Kalibrator S3 (200 pg/ml), im Doppelansatz, in die Mikroküvetten D1 und D2.
 100 µl Kalibrator S2 (800 pg/ml), im Doppelansatz, in die Mikroküvetten E1 und E2.
 100 µl Kalibrator S1 (3200 pg/ml), im Doppelansatz, in die Mikroküvetten F1 und F2.
- 3d. 100 µl Kontrolle Tief, im Doppelansatz, in die Mikroküvetten G1 und G2.
 100 µl Kontrolle Hoch, im Doppelansatz, in die Mikroküvetten H1 und H2.
- 3e. 100 µl der jeweiligen Zellüberstände, im Doppelansatz, in die weiteren Mikroküvetten pipettieren.
4. 50 µl Enzym-Marker zu allen Mikroküvetten zugeben.
5. 50 µl Antikörper-Lösung zu allen Küvetten zugeben.
6. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie bedecken und 2 Stunden auf einem Platten-Schüttler bei 800-1000 rpm und 18-28°C inkubieren.
Hinweis: Die Mikrotiter-Platte kann auch 16-20 Stunden bei 2-8°C inkubiert werden.
7. Abdeckfolie entfernen. Mikroküvetten entleeren und je dreimal mit mindestens 300 µl Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
Wichtig: pNPP Substrat vor Gebrauch auf 18-28°C erwärmen lassen.
8. 200 µl pNPP Substrat zu allen Mikroküvetten zugeben.
9. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie zudecken, vor direktem Licht schützen und 30 Minuten auf einem Platten-Schüttler bei 800-1000 rpm und 18-28°C inkubieren.
10. Abdeckfolie entfernen und Reaktion mit 50 µl Stopp-Lösung in allen Mikroküvetten beenden. Auf dem Platten-Schüttler kurz mischen.
11. Absorption innerhalb von 30 Minuten bei 405 nm mit einem Mikrotiter-Platten-Photometer messen.

GLOSSAR

Maximale Bindung (MB, S0): Technisch maximale Absorption des ELISA Tests. Dieser Wert wird zur Berechnung des entsprechenden Bindungs-Prozentsatzes (B/B_0) benötigt.

Blank (NSB): Technisch unspezifische Absorption des ELISA Tests. Dieser Wert wird von der Kalibratoren-, Kontrollen- und Proben-Absorption subtrahiert.

STANDARDKURVE

Absorption bei 405 nm für jeden Kalibrator, die Maximale Bindung ($MB=S_0$) und Blank (NSB) messen, den Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnen und den Blank-Mittelwert davon subtrahieren (= korrigierter Absorption-Mittelwert).

Die Bindung der jeweiligen Kalibratorenpaare als Prozentsatz der maximalen Bindung berechnen, wobei die NSB-korrigierte MB-Absorption als 100% gesetzt wird.

$$B/B_0 (\%) = \text{Bindungs-Prozentsatz} = \frac{\text{Net - Absorption}}{\text{Net - MB - Absorption}} \times 100$$

Bindungs-Prozentsatz (Vertikalachse) gegen die sLT-Konzentration in pg/ml (Horizontalachse) auf halb-logarithmischem Papier auftragen und die entsprechende geglättete Funktion mit einem vier Parameter Algorithmus berechnen.

PROBEN UND KONTROLLE

Absorption bei 405 nm jeder Proben- und Kontroll-Mikroküvette messen. Den Mittelwert aus den Doppelmessungen berechnen, den Blank-Mittelwert davon subtrahieren und die korrigierten Absorptions-Mittelwerte registrieren.

Die Bindung der jeweiligen Proben- und Kontrollpaare als Prozentsatz der maximalen Bindung berechnen, wobei die NSB-korrigierte MB-Absorption als 100% gesetzt wird.

Den B/B_0 -Wert der Proben und Kontrollen auf der Vertikalachse auffinden und von diesen Punkten aus, eine horizontale Gerade bis zur Kurve aufzeichnen, um die sLT-Konzentration (pg/ml) auf der Horizontalachse abzulesen.

HINWEIS: Falls die anfängliche Konzentration einer unbekannt Probe höher als die höchste Kontrolle ist, muss der Zellenüberstand mit ELISA-Puffer verdünnt und nochmals gemäss der Anleitung gemessen werden. Die zusätzliche Verdünnung muss in der sLT-Konzentrationsberechnung der unbekannt Probe berücksichtigt werden.

STIMULATIONSWERT

$$\begin{aligned} \text{Stimulationswert Kontrolle} &= \text{sLT Konzentration (Stimulation Kontrolle)} - \text{sLT Konzentration (Background)} \\ \text{Stimulationswert Allergen} &= \text{sLT Konzentration (Allergen Stimulation)} - \text{sLT Konzentration (Background)} \end{aligned}$$

Ein Beispiel typischer Werte ist in Table 31 und Figure 1 dargestellt. Die Daten dienen nur der Illustration und sind nicht dazu bestimmt, die Ergebnisse eines anderen Testensatzes danach zu berechnen. Eine Eichkurve muss für jeden Probenansatz jeweils neu ermittelt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE DES TESTS

Um eine akkurate Testverifizierung zu garantieren ist es wichtig die folgenden Qualitätskontrollparameter zu verfolgen:

- OD Werte der unspez. Bindung (Blank): <200 mOD
- Erwarteter Wert bei 50% Bindung (ED-50): 200-400 pg/ml sLT
- Patienten Background: <200 pg/ml sLT
- Stimulationskontrolle: >200 pg/ml sLT

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

INTERPRETATION DER STIMULATIONSKONTROLLE

In allergischen wie auch in nicht-allergischen Patienten sollte die Netto Stimulation (nach Abzug des Backgrounds) von mindestens 200 pg/ml sLT erreicht werden. Die Stimulation kontrolliert die Leukotriene Produktion welche aufgrund einer Kreuzverbindung des hoch affinen IgE Rezeptors (FcεRI) der Basophilen Leukozyten durch den Anti-IgE Rezeptor Antikörper ausgelöst wird. Die Stimulation kontrolliert kann mit der FcεRI Dichte der Patientenbasophilen korreliert werden und zeigt die Fähigkeit zur sLT Ausschüttung der Zellen.

INTERPRETATION DER ALLERGENSTIMULATION

Bei **Inhalations-** und **Lebensmittel-Allergenen**, wie auch für **Insektengifte** und **Latex** wird empfohlen, Netto Stimulationen, welche höher als 200 pg/ml sLT sind, als positiv zu betrachten.

In einer aktuellen Studie (4) wurde der Cut-off für **BIENEN** (BAG2-I1) und **WESPEN GIFT** (BAG2-I3) auf einen Wert von **270 pg/ml** mit einem Graubereich von 200-270 pg/ml festgelegt.

Aufgrund der Tatsache, dass **Medikamenten Allergene**, **chemische Allergene** und **Lebensmittelzusatzstoffe** nur eine kleine Erhöhung der sLT Freisetzung bewirken, hat BÜHLMANN für jedes einzelne dieser Allergene einen INDIVIDUELLEN TECHNISCHEN GRENZWERT (CUT-OFF) ermittelt. Diese Werte repräsentieren die Mittelwerte + 3 Standardabweichungen der Netto Stimulation von bis zu 20 stimulierten Proben von normalen Blutspendern. Aufgrund von Variationen zwischen den Laboratorien und der Präzision des Tests liegen die ermittelten Grenzwerte nicht unter 40 pg/ml sLT. Die ermittelten technischen Grenzwerte sind in den Allergen Data Sheets aufgelistet (s. www.buhlmannlabs.ch).

Hinweise:

- Bühlmann empfiehlt die Verwendung einer Grauzone, welche $\pm 20\%$ der individuellen technischen Cut-off Werte beträgt.
- Um die individuellen technischen Cut-off Werte anzuwenden, müssen die in der Arbeitsanleitung beschriebenen Qualitätskontroll Kriterien erfüllt werden.
- Diese Grenzwerte sollten nur als Richtlinien betrachtet werden. Klinisch relevante Grenzwerte müssen durch jedes Labor oder durch weitere Studien ermittelt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Ein vollständiges Verständnis dieser Testpackungsbeilage ist für den erfolgreichen Gebrauch des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur erreicht, durch die Anwendung „Guter Laborpraxis“ (aktuelle GLP Richtlinien) und die Einhaltung der Arbeitsanleitung.

Da es keine kommerziell erhältliche sLT-Kontrolle gibt, wird empfohlen, gesammelte Zellenüberstände (Pool) verschiedener sLT-Konzentrationen als interne Qualitätskontrolle anzuwenden (die Zellenüberstände sind bis 4 Monate bei -20°C haltbar). Alle Kontrollen müssen im etablierten Vertrauensbereich liegen. Die Vertrauensbereiche der synthetischen BÜHLMANN sLT-Kontrollen sind Lot-spezifisch und auf dem zusätzlichen Qualitätskontrollblatt angegeben.

Die Reproduzierbarkeit der Eichkurvenparameter und der Kontrollwerte sollte innerhalb des etablierten Erwartungsbereiches liegen. Falls die Präzision des Testes nicht mit dem etablierten Erwartungsbereich übereinstimmt und wiederholte Messungen ein technisches Problem ausschliessen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipettier-, Temperatur- und Zeitmessende Geräte, ii)

Photometer Eichung, iii) Verfallsdaten der Reagenzien, iv) Lagerung- und Inkubations-Bedingungen, v) die pNPP Substratlösung sollte farblos sein vi) Wasserreinheit.

LIMITIERUNGEN

Ein negatives CAST®-2000 Ergebnis für ein spezifisches Allergen kann ein mögliches Auftreten einer (sogar schweren) klinischen Reaktion nicht ausschliessen. Patienten mit einer Kasuistik von Medikamenten-überreaktionen sollten deshalb mit einer zusätzlichen Methode getestet werden, z.B. kontrollierte *in vivo* Provokation oder Pricktest (falls anwendbar), bevor das Medikament dem Patienten verabreicht wird.

LEISTUNGSMERKMALE

KINETIK DER ZELLSTIMULATION: Ein Beispiel der sLT-Freisetzung ist in Figure 2 angegeben. Die Kinetik kann von Patient zu Patient variieren. Jedoch wird eine stabile Stimulation nach **40 Minuten** erreicht.

INTRA-ASSAY PRÄZISION DES ELISA (WITHIN-RUN): 4.6%. Die Intra-Assay Präzision wurde bestimmt durch die 24-fache Doppelmessung im gleichen Ansatz. Die Werte sind in pg/ml sLT angegeben (siehe Table 32).

INTRA-ASSAY PRÄZISION DER ZELL-STIMULATION UND ELISA KOMBINIERT: 11.3%. Die Statistik wurde bestimmt durch die 10-fache Doppelmessung im gleichen Ansatz. Die Werte sind in pg/ml sLT angegeben (siehe Table 33).

INTER-ASSAY PRÄZISION DES ELISA (RUN-TO-RUN): 15.4%. Die Inter-Assay Präzision wurde bestimmt durch die Doppelmessung in 20 verschiedenen Ansätzen. Die Werte sind in pg/ml sLT angegeben (siehe Table 34).

SENSITIVITÄT: 19 pg/ml. Die kleinste nachweisbare sLT-Menge wurde, durch Subtraktion von zwei Standardabweichungen (SD) vom Mittelwert aus 20 Nullstandard-Replikaten (ELISA-Puffer, S0) auf der Eichkurve bestimmt.

VERÜNNUNGSLINEARITÄT: 114.6%. Drei unverdünnte oder mit ELISA-Puffer verdünnte Patientenproben wurden nach der Zellstimulation gemessen. Die Werte sind in pg/ml sLT angegeben (siehe Table 35).

WIEDERFINDUNG: 99.5%. Drei nicht-stimulierte Patientenproben wurden vor und nach der Zugabe verschiedener LTD₄ Mengen gemessen. Die Werte sind in pg/ml sLT angegeben (siehe Table 36).

SPEZIFIZITÄT: Kreuzreaktivität der verwendeten monoklonalen Antikörper wurde bei 50% Bindung bestimmt (siehe Table 37).

ERWARTETE WERTE

Der Unterschied der sLT Konzentrationen von allergen-stimulierten Proben im Vergleich mit dem dazugehörigen Background Wert zeigt die Fähigkeit zur Produktion von sLT der Basophilen Zellen. Die Background Werte von 100 Blutspendern vom Schweizerischen Roten Kreuz, Basel wurden bestimmt, und ergaben Werte im Bereich 20-140 pg/ml sLT (2.5-97.5 Percentile) und eine Netto Stimulation (positiv Kontrolle) von 396- >3200 pg/ml sLT (siehe Table 38). Allergen exponierte Patienten und Atopiker, insbesondere Latexallergiker, können höhere Backgroundwerte aufweisen. Trotzdem wurde in den meisten Fällen ein signifikanter Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Proben beobachtet.

DOMAINE D'UTILISATION

La trousse BÜHLMANN CAST[®]-2000 ELISA a été conçue pour la détermination diagnostique quantitative *in vitro* des sulfidoleucotriènes (sLT) produits par des leucocytes isolés, après exposition à certains antigènes spécifiques. L'essai est aussi utilisé pour tester les réactions allergiques chez le cheval. Le protocole est disponible sur demande.

PRINCIPE DU DOSAGE

Au cours du test CAST[®]-2000 ELISA (1), les leucocytes, ayant préalablement sédimentés sont activés par l'interleukine 3 (IL-3) et simultanément stimulés par des allergènes (2). Les basophiles, entre autres, produisent des cellules médiatrice de l'allergie comme, les sulfidoleucotriènes LTC₄ ainsi que leurs métabolites LTD₄ et LTE₄. La synthèse *de novo* de leucotriènes LTC₄ peut être IgE-dépendante ou non-IgE-dépendante. Dans le second cas, on parle généralement de pseudo-allergies (3). Ces sLT fraîchement synthétisés sont ensuite mesurés par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Le principe de la méthode CAST[®]-2000 ELISA est protégé par le brevet No. US5,487,977.

La technique CAST[®]-2000 ELISA comporte trois parties:

1. ISOLATION DES LEUCOCYTES: Une solution de dextrane est ajoutée au sang du patient afin d'en augmenter la viscosité. Les érythrocytes sont sédimentés après une incubation de 90 minutes à 18-28°C, alors que les leucocytes et les thrombocytes demeurent dans la fraction plasma. Le surnageant sanguin est ensuite soigneusement transféré dans un nouveau tube et les leucocytes sont sédimentés par une brève centrifugation. Le surnageant plasmatique contenant >90% des thrombocytes est rejeté et le culot de leucocytes est resuspendu dans du tampon de stimulation contenant de l'IL-3.

2. STIMULATION CELLULAIRE: Pour chaque échantillon cellulaire, une valeur basale propre est déterminée (background). On procède également à un contrôle de stimulation en additionnant un anticorps anti-récepteur IgE pour chaque échantillon. Les cellules sont stimulées durant une incubation de 40 minutes à 37°C, puis sont centrifugées. Le surnageant est analysé immédiatement ou peut être conservé à -20°C.

En tant que contrôle positif prouvant la viabilité et la fonctionnalité des cellules, un troisième échantillon est stimulé à l'aide d'un anticorps (Ab) dirigé contre le récepteur IgE humain de haute affinité (FcεRI). De manière similaire à un allergène, cet anticorps induit le cross-linking du récepteur Fcε I et stimule ainsi les cellules. Cet anticorps anti-récepteur IgE se lie au domaine 1 de la sous-unité α du récepteur IgE de forte affinité et est un anticorps non-inhibiteur. Ainsi, il va se lier au récepteur sans tenir compte du fait que ce dernier soit libre ou chargé d'IgE.

3. DETERMINATION DES LEUCOTRIENES: Le test ELISA est effectué sur microplaque pré-coatée. 16 puits par essai sont utilisés pour la courbe d'étalonnage et les contrôles. Par patient sont utilisés: deux puits pour l'expression basale, deux puits pour le contrôle de stimulation ainsi que 2 puits pour chaque allergène testé. Le marqueur enzymatique (la phosphatase alcaline = aPase) et les anticorps sont ajoutés au surnageant cellulaire ainsi qu'aux standards et aux contrôles. Après incubation et lavage, la microplaque est incubée avec le Substrat paranitrophénylphosphate (pNPP). Finalement, la réaction est terminée par addition de solution stop (NaOH 2N) et l'absorbance est mesurée à 405 nm au moyen d'un lecteur de microplaque.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

REACTIFS POUR L'ISOLATION ET LA STIMULATION CELLULAIRE

Réactifs	Quantité		Code	Reconstitution
	EK-CAST	EK-CAST5		
Solution dextrane sans conservateurs	1 fl. 20 ml	2 fl. 20 ml	B-CAST-DS	Prête à l'emploi
Tampon de stimulation sans conservateurs	1 fl. lyoph.	3 fl. lyoph.	B-CAST-STB	A reconstituer avec 50 ml d'eau ultra-pure, apyrogène
Contrôle de stimulation Anticorps anti-FcRI sans conservateurs	1 fl. lyoph.	2 fl. lyoph.	B-CAST-STCON	A reconstituer avec 3.5 ml d'eau ultra-pure, apyrogène

Table 13

REACTIFS POUR L'ELISA

Réactifs	Quantité		Code	Reconstitution
	EK-CAST	EK-CAST5		
Microplaques Plaques coatées avec des IgG de lapin anti-souris	2 plaques: 12 x 8	5 plaques: 12 x 8	B-CAST-MP	A laver 1 x avant utilisation
Films Adhésifs	6 pièces	15 pièces		
Tampon de lavage, concentré (20X) avec conservateurs	1 flacon 50 ml	3 flacons 50ml	B-CAST-WB	A reconstituer avec 950 ml d'eau déionisée
Tampon ELISA avec conservateurs	1 flacon 30 ml	1 flacon 80 ml	B-CAST-EB B-CAST5-EB ¹⁾	Prêt à l'emploi
Calibrateur²⁾ leukotriène D ₄ tamponné	5 x 1 fl. lyoph.	8 x 1 fl. lyoph.	B-CAST-CA ³⁾	A reconstituer avec 1 ml d'eau déionisée
Contrôle bas/élevé⁴⁾ leukotriène D ₄ tamponné	5 x 2 fl. lyoph.	8 x 2 fl. lyoph.	B-CAST-CONSET ⁵⁾	A reconstituer avec 1 ml d'eau déionisée
Réactif blanc²⁾ leukotriènes D ₄ tamponné	1 flacon lyoph.	1 fl. lyoph.	B-CAST-BR	A reconstituer avec 2 ml d'eau déionisée
Marqueur enzymatique LTD ₄ conjugué à la aPase, avec conservateurs	2 flacons lyoph.	3 fl. lyoph.	B-CAST-ELS B-CAST-EL ¹⁾	A reconstituer avec 5.5 ml (B-CAST-EL : 11 ml) de Tampon ELISA
Anticorps anti-sLT C ₄ /D ₄ /E ₄ de souris en tampon, avec conservateurs	1 flacon 11 ml	1 flacon 27.5 ml	B-CAST-AS B-CAST5-AS ¹⁾	Prêt à l'emploi
Substrat pNPP avec granules stabilisants	1 flacon 42 ml	1 flacon 105 ml	B-CAST-PNPP B-CAST5-PNPP ¹⁾	Prêt à l'emploi
Solution stop NaOH 2 N	1 flacon 11 ml	1 flacon 27.5 ml	B-CAST-NAOH B-CAST5-NAOH ¹⁾	Prête à l'emploi Corrosif

Table 14

¹⁾ Code de commande pour EK-CAST5

²⁾ Après reconstitution, le calibrateur contient 3200 pg/ml et le Blanc 32'000 pg/ml de leucotriènes D₄.

³⁾ REMARQUE: référence du catalogue pour le set de calibrateurs: B-CAST-CA5 ou B-CAST-CA8 ; contiennent : 5x ou 8x B-CAST-CA

⁴⁾ Les contrôles contiennent des quantités spécifiques à chaque lot. Pour les concentrations exactes, il convient de se référer aux limites de confiance communiquées avec chaque lot de production.

⁵⁾ REMARQUE: référence du catalogue pour le set de contrôles: B-CAST-CONSET5 ou B-CAST-CONSET8; contiennent : 5x ou 8x B-CAST-CONSET

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non ouverts	
Stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette, sauf pour le calibrateur , le blanc et les contrôles qui doivent être stockés à -20°C au minimum.	
Réactifs ouverts / reconstitués	
Solution dextrane	Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.
Tampon de stimulation	Stable durant 6 mois à -20°C. Aliquoter si une utilisation multiple est envisagée.
Contrôle de stimulation	Stable durant 2 mois à 2-8°C. Pour des Stockages plus long, aliquoter et congeler à -20°C durant 6 mois.
Microplaque	Retirer les barrettes non utilisées du support en

	s'assurant que chaque puits est au moins à moitié rempli de tampon de stockage. Ajouter une solution saline tamponnée (TBS), le cas échéant. Conserver les barrettes restantes couvertes d'un film adhésif dans la pochette d'aluminium refermée durant 6 mois à 2-8°C.
Tampon de lavage	Stable durant 2 mois à 2-8°C.
Calibrateur	Ne pas conserver.
Contrôles	
Réactif blanc	Stable durant 2 mois à -20°C. A aliquoter si un emploi répété est envisagé.
Marqueur enzymatique	Stable durant 2 mois à 2-8°C.
Tampon ELISA	Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.
Anticorps	
Substrat pNPP	
Solution stop	Stable à 18-28°C ou à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.

Table 15

ALLERGENES ET REACTIFS FOURNIS SUR DEMANDE

Réactifs	Quantité	Code
Allergènes¹⁾ lyophilisés ou prêts à être dilués	1 flacon	consulter la liste des allergènes (www.buhlmannlabs.ch)
C5a C5a humain recombinant	1 flacon	B-CAST-C5A-R

Table 16

1) Allergènes protéiques: Les allergènes protéiques BÜHLMANN sont soumis à un contrôle de qualité et sont conditionnés sous forme de concentré liquide. Les allergènes protéiques doivent être stockés réfrigérés et doivent être dilués avant utilisation.

Allergènes médicamenteux et chimiques: Les allergènes de faible masse moléculaire des LABORATOIRES BÜHLMANN sont conditionnés sous forme lyophilisée. Les allergènes de faible masse moléculaire doivent être stockés réfrigérés et reconstitués avant utilisation.

Merci de consulter le livret des allergènes (BÜHLMANN Allergen Booklet) et les **fiches techniques** sur le site de BÜHLMANN (www.buhlmannlabs.ch).

ALLERGÈNES D'AUTRES SOURCES

Des allergènes provenant d'autres sources peuvent également être utilisés avec le test CAST®-2000-ELISA en tenant compte des limitations suivantes:

- Aucun allergène lié à une matrice (ni en phase liquide ni en solide).
- Aucune préparation d'allergène contenant des leucotriènes.
- Aucune préparation d'allergène contenant des substances cytotoxiques (stabilisateurs, conservateurs) tels que le glycérol, le phénol, l'azotate de sodium ou le merthiolate (thimérosal).

Le procédé de fabrication des allergènes du test CAST®-2000 peut être demandé à votre distributeur local ou, directement en contactant BÜHLMANN.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision réglables avec pointes jetables pour 10-100 µl, 200-1000 µl et 1-5 ml.
- Pipettes à multi-injection réglable avec embout jetable pour 25-1000 µl.
- Tubes jetables en polypropylène pour la séparation cellulaire.
- Tubes jetables en polypropylène ou polystyrène et microplaques pour culture cellulaire, pour la stimulation cellulaire.
- Flux laminaire pour la séparation et la stimulation cellulaire (optionnel).

- Centrifugeuse réfrigérée pour une centrifugation à 130-1000 x g.
- *Eau ultrapure et apyrogène pour les réactifs de stimulation cellulaire.*
- Bain-marie (ou incubateur) à 37°C.
- Eprouvettes graduées de 50 ml et 1 l pour la préparation des tampons.
- Appareil de lavage/aspiration pour microplaques
- Eau distillée ou déionisée
- Papier absorbant.
- Agitateur rotatif pour microplaques
- Lecteur de microplaques pour la mesure de l'absorbance à 405 nm.

RECOMMANDATIONS ET PRECAUTIONS D'UTILISATION

RÉACTIFS CONTENANT DU MATÉRIEL DE SOURCE HUMAINE

Tous les composants de cette trousse contiennent des composants d'origine humaine, excepté la solution dextrane, le substrat pNPP et la solution stop. Chaque unité de sérum de donneur utilisée dans la préparation des réactifs de la trousse a été testée par une méthode approuvée par la FDA et a été séronégative pour l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) et pour les anticorps anti-VIH1/2 et anti-HCV. Cependant, bien que ces méthodes soient très fiables, il ne peut être garanti que ce matériel ne puisse transmettre une hépatite B ou le SIDA. *En conséquence, tous les échantillons et les réactifs doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux.* Tous les produits contenant du matériel d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en respectant les précautions d'usage.

SUBSTRAT ET SOLUTION STOP

Le substrat contient du *para*-nitrophénylphosphate (pNPP). La solution stop contient de l'hydroxyde de sodium 2N. Chacune de ces substances irrite les yeux, la peau et les muqueuses. Eviter par conséquent, tout contact avec les yeux, la peau et les habits et porter des habits, des gants et des lunettes de protection adaptés. En cas de contact avec les yeux ou la peau, immédiatement laver abondamment avec de l'eau (*cf.* la feuille de données de sécurité - Material Safety Data Sheet).

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Il est recommandé d'éviter l'administration systémique de médicaments anti-allergies aux patients, tels que les antihistaminiques, corticostéroïdes ou l'acide chromoglicique (DSCG) précédant le prélèvement sanguin. Le temps de latence dépend de différents facteurs, comme la pharmacocinétique et la disponibilité biologique des substances, la durée et le mode d'administration etc. Pour éviter les interactions avec l'administration systémique de médicament Bühlmann recommande l'arrêt de la prise de médicament, si possible, trois à sept jours avant la collecte d'échantillon de sang.

Les patients supposés souffrir d'une hypersensibilité au médicament ne devraient pas être testés pour le médicament en question juste après une réaction défavorable. Une phase de rétablissement de plusieurs semaines après la réaction est recommandée. Différentes études montrent que pour atteindre la sensibilité de test la plus élevée, il convient de tester le patient dans un laps de temps d'une demi année après la réaction défavorable au médicament.

Important: Les échantillons de sang provenant de patients qui vont être testés *in vivo*, comme le test cutané ou la

provocation orale, doivent être prélevés avant toute exposition à l'allergène.

Prélever suffisamment de sang dans les tubes à ponction veineuse EDTA. 200 µl de sang entier sont nécessaires par tube de réaction Déterminer la quantité de sang minimale requise à l'aide du tableau suivant:

Nombre d'allergènes à testés	Quantité de sang requis
1-5	2.0 ml
6-10	3.0 ml
11-15	4.0 ml
16-20	5.0 ml

Table 17

Important :

- Effectuer la stimulation cellulaire durant les **24 heures** suivant le prélèvement de sang.
- Les échantillons sanguins doivent être conservés à **2-8°C**.
- Ne pas centrifuger le sang.

REMARQUES TECHNIQUES

QUALITE D'EAU RECOMMANDÉE POUR LE CAST®-ELISA

Stimulation cellulaire: L'utilisation d'eau ultrapure et apyrogène pour la reconstitution des réactifs de stimulation cellulaire (tampon et contrôle de stimulation) est essentielle à l'obtention d'une stimulation des leucocytes reproductible. Les qualités d'eau suivantes peuvent être utilisées: eau pour culture cellulaire ou perfusion, eau doublement distillée ultrafiltrée au moyen d'un ultrafiltre avec un seuil d'exclusion à 10 kDa et régulièrement désinfecté.

ELISA: Tous les réactifs doivent être reconstitués avec de l'eau déionisée, ou doublement distillée, ou de même qualité que celle utilisée pour les réactifs de stimulation cellulaire.

PRÉCAUTIONS POUR ÉVITER LA CONTAMINATION PAR ALLERGÈNE DURANT LA STIMULATION CELLULAIRE

Les aéroallergènes présents dans le laboratoire peuvent contaminer les échantillons de sang ou les suspensions cellulaires ouverts, pouvant potentiellement conduire à un background élevé ou à une stimulation faussement positive.

Pour cette raison, il convient de veiller à ce que les tubes contenant les échantillons sanguins et de stimulation cellulaire, soient couverts. Éviter les acariens de la poussière (dust mites), les plantes ainsi que les fenêtres ouvertes dans le laboratoire où la stimulation cellulaire est effectuée. *Nous recommandons d'effectuer la préparation des cellules et les étapes de la stimulation sous flux laminaire.*

DILUTION DU STANDARD

*Reconstituer un nouveau flacon de standard et préparer une nouvelle courbe d'étalonnage pour chaque nouvel essai. Les **calibrateurs** et **contrôles reconstitués ne sont pas stables** et doivent être utilisés sans délai.*

Afin d'obtenir une courbe d'étalonnage complète, la dilution en série du calibrateur est effectuée comme suit:

- Identifier trois tubes S2 à S4 et y pipeter 300 µl de tampon ELISA.
- Pipeter 100 µl de calibrateur reconstitué (S1, 3200 pg/ml) dans le tube S2 et vortexer.
- Transférer 100 µl de S2 dans S3 et vortexer. Transférer 100 µl de S3 dans S4 et vortexer.

Les concentrations en sLT correspondantes seront:

S1: 3200 pg/ml	S4: 50 pg/ml
S2: 800 pg/ml	S0: calibrateur zéro
S3: 200 pg/ml	(tampon ELISA uniquement).

STIMULATION CELLULAIRE

Les volumes de réactifs à utiliser aux étapes 1 à 4 sont relatifs au volume de l'échantillon et doivent être déterminés à l'aide du tableau ci-dessous:

Tableau des volumes de réactifs pour la stimulation		
Sang	Solution de dextrane	Tampon de stimulation
1 ml	0.25 ml	1 ml
2 ml	0.50 ml	2 ml
3 ml	0.75 ml	3 ml

Table 18

Les volumes utilisés aux étapes 1 à 8 ont été calculés, à titre d'exemple, pour de 2 ml de sang d'un seul patient, testé pour un seul allergène:

1. Pipeter 2 ml de sang dans un tube en polypropylène, ajouter 0.5 ml de Solution de dextrane et vortexer légèrement à faible vitesse.
2. Incuber 90 minutes à 18-28°C.
3. Transférer la phase supérieure dans un second tube et centrifuger durant 15 minutes à 130 x g et 18-28°C.
4. Retirer le surnageant et suspendre à nouveau les cellules dans 2 ml de tampon de stimulation. *Avancer à l'étape 5 sans interruption.*

Remarques: L'incubation de l'étape 5 peut être effectuée dans des petits tubes en polypropylène ou polystyrène et en microplaques de polystyrène non activées. *La procédure suivante utilise des tubes de propylène à l'étape 5, à titre d'exemple.* Si la suspension de cellules est suffisante, les volumes à l'étape 5 peuvent être doublés. Ceci permet d'aliéquer et de congeler les surnageants pour une éventuelle répétition de la mesure du même échantillon.

- 5a. Identifier les tubes de chaque patient: PB (background du patient), PC (contrôle du patient), A1 (allergène 1), etc.
- 5b. Pipeter 50 µl de tampon de stimulation (background) dans le tube PB de chaque patient.
- 5c. Pipeter 50 µl de contrôle de stimulation dans le tube PC de chaque patient.
- 5d. Pipeter 50 µl d'allergène dans les tubes correspondants des patients.
6. Pipeter 200 µl de la suspension cellulaire de chaque patient dans les tubes correspondants.
7. Vortexer doucement, couvrir et incuber les tubes durant 40 minutes à 37°C.
8. Vortexer afin de dissoudre les agrégats formés. Centrifuger durant 3 minutes à 1000 x g et 2-8°C. La réfrigération est recommandée afin d'obtenir un culot compact et d'éviter la dégradation des sLT. Pipeter soigneusement 2 x 100 µl de surnageant cellulaire de chaque tube pour utilisation à l'étape 3e. de la procédure ELISA.

Important: Passer immédiatement à la procédure ELISA ou conserver le surnageant cellulaire à ≤-20°C (stable jusqu'à 4 mois).

PROCEDURE ELISA

1. Déterminer la quantité requise de barrettes de microplaque, coatées avec les anticorps de capture, en fonction du nombre de patients et d'allergènes testés en plus des 16 puits nécessaire pour la courbe d'étalonnage et les contrôles.

Les barrettes non utilisées doivent être retirées du support et remises dans la pochette aluminium refermée pour la conservation à 4°C en s'assurant que tous les puits soient remplis à moitié de Tampon de stockage. Le cas échéant, ajouter une solution TBS (Tris-buffered saline).

2. Vider le tampon de stockage des puits et laver une fois chacun des puits avec au moins 300 µl de tampon de lavage. Vider les puits et les sécher en tapant fermement la microplaque sur du papier absorbant.

- 3a. Pipeter 100 µl de blanc, en double, dans les puits A1 et A2.

- 3b. Pipeter 100 µl de tampon ELISA (calibrateur zéro, S0), en double, dans les puits B1 et B2.

- 3c. Pipeter 100 µl de calibrateur S4 (50 pg/ml), en double, dans les puits C1 et C2.

Pipeter 100 µl de calibrateur S3 (200 pg/ml), en double, dans les puits D1 et D2.

Pipeter 100 µl de calibrateur S2 (800 pg/ml), en double, dans les puits E1 et E2.

Pipeter 100 µl de calibrateur S1 (3200 pg/ml), en double, dans les puits F1 et F2.

- 3d. Pipeter 100 µl de contrôle faible, en double, dans les puits G1 et G2.

Pipeter 100 µl de contrôle élevé, en double, dans les puits H1 et H2.

- 3e. Pipeter 100 µl de chaque surnageant cellulaire, en double, dans les puits suivants.

4. Ajouter 50 µl de marqueur enzymatique dans chaque puits.

5. Ajouter 50 µl d'anticorps dans chaque puits.

6. Couvrir à l'aide d'un film adhésif et incuber la microplaque sur un agitateur de microplaques à 800-1000 rpm durant 2 heures à 18-28°C.

Remarque: Alternativement, incuber la microplaque durant 16-20 heures à 2-8°C.

7. Retirer le film adhésif, vider puis laver 3 fois chaque puits avec au moins 300 µl de tampon de lavage. Vider les puits et les sécher en tapant fermement la microplaque sur du papier absorbant.

Important: Laisser le Substrat pNPP atteindre une température de 18-28°C avant utilisation.

8. Ajouter 200 µl de Substrat pNPP dans chaque puits.

9. Couvrir la microplaque avec un nouveau film adhésif et incuber la microplaque sur un agitateur de microplaques à 800-1000 rpm durant 30 minutes à 18-28°C. Protéger la microplaque de la lumière.

10. Retirer le film adhésif. Stopper la réaction en ajoutant de 50 µl de solution stop à chaque puits et mélanger brièvement avec l'agitateur de microplaques.

11. Lire l'absorption à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque durant les 30 minutes suivant l'étape 10.

CALCULATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

GLOSSAIRE

Liaison Maximale (MB, S0): Absorption technique maximale de l'ELISA utilisée dans le calcul du pourcentage de liaison (B/B₀).

Blanc (NSB): Absorption technique non-spécifique de l'ELISA. Cette valeur est soustraite des mesures d'absorptions des calibrateurs, contrôles et échantillons.

COURBE D'ETALONNAGE

Noter l'absorbance à 405 nm pour chaque calibrateur, liaison maximale (MB = S0) et blanc (NSB).

Calculer la moyenne des valeurs en duplicata, soustraire la moyenne des blancs et noter les moyennes (= absorbance moyenne corrigée).

Calculer la liaison de chaque paire de calibrateurs en tant que pourcentage de la liaison maximale, en fixant l'absorbance MB NSB-corrigée à 100%:

$$B/B_0 (\%) = \text{pourcentage lié} = \frac{\text{absorbance nette}}{\text{absorbance MB nette}} \times 100$$

Sur un papier semi-logarithmique (lin/log), reporter le pourcentage de liaison sur l'axe vertical par rapport à la concentration de sLT des standards exprimée en picogrammes/ml (pg/ml) sur l'axe horizontal.

Tracer la courbe d'étalonnage ou la calculer en au moyen d'un algorithme à 4 paramètres.

ECHANTILLONS ET CONTROLES

Noter l'absorbance à 405 nm pour chaque échantillon et contrôle.

Calculer la moyenne des deux valeurs obtenues, soustraire la valeur moyenne des blancs et reporter les absorbances moyennes corrigées obtenues.

Calculer la liaison de chaque paire d'échantillons et de contrôle en tant que pourcentage de la liaison maximale, en fixant l'absorbance MB NSB-corrigée à 100%.

Localiser la valeur B/B₀ des échantillons et contrôles sur l'axe vertical, tirer une droite horizontale à la hauteur de chaque valeur B/B₀ et lire la concentration de sLT (pg/ml) à l'intersection de la droite et de la courbe d'étalonnage sur l'axe horizontal.

REMARQUE: Si la concentration initiale d'un échantillon inconnu est supérieur à celle du standard le plus élevé, le surnageant cellulaire devrait être dilué avec le tampon ELISA et mesuré à nouveau selon la procédure standard. La dilution doit être prise en compte lors du calcul de la concentration de sLT de l'échantillon indéterminé.

DEGRE DE STIMULATION (STIMULATION YIELD)

$$\text{Degré de Stimulation du Contrôle} = \frac{\text{conc. de sLT (Contrôle de stimulation)}}{\text{conc. de sLT (Background)}}$$

$$\text{Degré de Stimulation par Allergène} = \frac{\text{conc. de sLT (Stimulation par Allergène)}}{\text{conc. de sLT (Background)}}$$

Cf. Table 31 et Figure 1 pour un exemple typique de valeurs obtenues. Ces données sont uniquement présentées à titre illustratif. Une courbe d'étalonnage doit être déterminée pour chaque série d'échantillons à doser.

CONTROLE QUALITE DU TEST

Afin de pouvoir procéder à une vérification précise de la performance du test, il est impératif de garder un suivi des paramètres de contrôle qualité suivants :

- absorbance (OD) du blanc : < 200 mOD

- Dose estimée à 50% de liaison (ED-50) : 200-400 pg/ml sLT
- Valeur du background du patient : < 200 pg/ml sLT libérés
- Valeur du contrôle de stimulation : > 200 pg/ml sLT libérés (après soustraction du background).

INTERPRETATION DES RESULTATS

INTERPRETATION DU CONTROLE DE STIMULATION

Aussi bien chez les personnes allergiques que non-allergiques, un taux de stimulation de contrôle net (après soustraction du background) d'au moins 200 pg/ml devrait être observé en utilisant le contrôle de stimulation. Le contrôle de stimulation correspond à la production de leucotriènes due au cross-linking des récepteurs de haute affinité pour l'IgE (Fc ϵ RI) sur les basophiles par un anticorps anti-récepteur IgE.

Le contrôle de stimulation peut être corrélé avec la densité de Fc ϵ RI sur la surface des basophiles du patient ainsi qu'avec la capacité de ces mêmes basophiles à être libérés.

INTERPRÉTATION DE LA STIMULATION PAR LES ALLERGÈNE

Pour les **ALLERGÈNES INHALATOIRES** et **ALIMENTAIRES** ainsi que pour le **LATEX** et l' **α -AMYLASE**, nous proposons de considérer les individus présentant une stimulation supérieure à 200 pg/ml sLT comme positifs au regard de l'allergène testé.

Lors d'une récente étude (4), la valeur seuil clinique pour le **VENIN D'ABEILLE** (BAG2-I1) et de **GUEPE** (BAG2-I3) a été définie à **270 pg/ml**, avec une zone d'incertitude allant de 200 à 270 pg/ml.

En raison de la faible augmentation de la libération de sLT avec les **ALLERGÈNES MÉDICAMENTEUX**, les **ALLERGÈNES CHIMIQUES** et les **ADDITIFS ALIMENTAIRES**, les Laboratoires Bühlmann ont établi une **VALEUR SEUIL TECHNIQUE INDIVIDUELLE** pour chacun de ces allergènes. Ces valeurs correspondent à la moyenne + 3 écarts-types de la stimulation nette de 20 échantillons sanguins stimulés provenant de donneurs normaux. En raison des variations entre laboratoires et de la précision du dosage, les valeurs seuil ne sont pas en dessous de 40 pg/ml. Les valeurs seuil techniques sont présentées dans les **fiches techniques** (Se référer à www.buehlmannlabs.ch).

Remarques:

- Bühlmann recommande l'utilisation d'une zone d'incertitude incluant $\pm 20\%$ de la valeur seuil technique individuelle.
- Pour utiliser la valeur technique individuelle, le test EK-CAST doit être conforme aux critères de contrôle qualité.
- Les valeurs seuil ne sont qu'indicatives. Des valeurs seuil cliniquement significatives devraient être établies au moyen d'études complémentaires par chaque laboratoire.

CONTROLE DE QUALITE

Une lecture exhaustive de ce manuel est recommandée pour l'utilisation correcte de la trousse. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail en laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire usuelles) et en suivant fidèlement les recommandations de cette brochure.

Comme il n'existe pas de référence pour les sLT commercialement disponible, nous recommandons d'utiliser comme référence interne de contrôle de qualité (les surnageants cellulaires sont stables durant 4 mois à -20°C). Tous les contrôles doivent avoir une valeur comprise entre les limites de confiance établies. Les limites de confiance des sLT synthétiques de contrôle des LABORATOIRES BÜHLMANN sont spécifiques à chaque

lot et sont indiquées sur la feuille de contrôle contenue dans chaque trousse.

La reproductibilité des valeurs relatives des contrôles devraient être comprises entre les limites d'acceptabilité propres à chaque laboratoire. Si la précision des mesures ne correspond pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé contrôler les paramètres suivants: i) pipetage, appareils de contrôle de température et de temps, ii) calibrage des instruments, iii) date de péremption des réactifs, iv) conditions de stockage et d'incubation, v) la solution de substrat pNPP devrait être incolore, vi) pureté de l'eau.

LIMITATIONS

Un résultat négatif obtenu à l'aide du CAST[®]-2000 pour un allergène spécifique n'exclut pas l'apparition potentielle (même sévère) d'une réaction clinique chez le patient. Dans le cas d'allergies médicamenteuses et de résultat négatif au test CAST[®]-2000, il convient de procéder à des tests complémentaires (provocation *in vivo* ou un test "prick skin" si applicable), avant une nouvelle administration du médicament en cause.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

CINETIQUE DE LA SIMULATION CELLULAIRE: Un exemple de la cinétique de production de sLT est représenté à la Figure 2. La cinétique est variable d'un individu à l'autre. Cependant, la stimulation se stabilise (plateau) après **40 minutes** d'incubation.

PRÉCISION INTRA-ESSAI DE L'ELISA (WITHIN-RUN): 4.6%. La précision intra-essai a été calculée à partir de 24 doubles lors d'un seul et même essai pour chaque échantillon. Les valeurs sont exprimées en pg/ml de sLT (Table 32).

PRÉCISION INTER-ESSAI DE LA STIMULATION CELLULAIRE ET DE L'ELISA COMBINES: La statistique a été calculée d'après les mesures de 10 tubes de la stimulation cellulaire de chaque échantillon lors d'un seul et même essai. Les valeurs sont exprimées en pg/ml de sLT (Table 33).

PRÉCISION INTER-ESSAI DE L'ELISA (RUN-TO-RUN): 15.4%. La précision inter-essai a été calculée pour chaque échantillon à partir de 20 doubles mesurés lors de 20 essais différents. Les valeurs sont exprimées en pg/ml de sLT (Table 34).

SENSITIVITE ANALYTIQUE DE L'ELISA: 19 pg/ml. La dose minimale détectable de sLT a été déterminée comme étant 19 pg/ml par soustraction de deux déviations standards de l'absorption moyenne de 20 tubes de zéro (tampon ELISA, S0) et par la lecture de la concentration correspondante sur la courbe d'étalonnage obtenue lors de la même série de mesures.

LINEARITE DE DILUTION: 114.6%. Trois échantillons de patients ont été mesurés après stimulation cellulaire, dilués ou non dilués avec le tampon ELISA. Les valeurs sont exprimées en pg/ml de sLT (Table 35).

TEST DE RECUPERATION: 99.5%. Trois échantillons non stimulés de patient ont été mesurés avant et après «spiking» avec différentes quantités de sLT D₄. Les valeurs sont exprimées en pg/ml de sLT (Table 36).

SPECIFICITE: Les réactivités croisées des anticorps monoclonaux ont été déterminées à 50% de liaison (Table 37).

VALEURS ATTENDUES

La différence entre la concentration de sLTs dans l'échantillon stimulé par allergène et celle du background (stimulé avec le tampon de stimulation uniquement) indique la concentration des basophiles du patient à libérer des sLTs. La concentration du background déterminée à partir de 100 donneurs de sang de la Croix Rouge suisse à Bâle

se trouvait entre 20 et 140 pg/ml (2.5 et 97.5 percentile) et une stimulation nette (contrôle positive) de 396- >3200 (Table 38). Cependant, les patients exposés à l'allergène *in vivo* ou les patients atopiques, particulièrement ceux sensibles au latex, peuvent présenter des taux de sLTs de base (background) beaucoup plus élevés. Néanmoins, une différence significative entre les échantillons stimulés et non stimulés a été observée dans la plupart des cas.

fondello cellulare che contiene i leucociti è risospeso con tampone di stimolazione contenente IL-3.

2. STIMOLAZIONE CELLULARE: oltre che per gli allergeni di interesse, ogni campione cellulare è testato per verificare il livello basale di rilascio (= background) e quello dopo stimolazione con anticorpi diretti verso i recettori delle IgE (= stimolazione di controllo). La stimolazione cellulare avviene a 37°C per 40 minuti. Al termine, le cellule vengono centrifugate ed il supernatante può essere congelato e conservato o immediatamente testato per dosare la concentrazione dei sLT con il sistema ELISA. Come controllo positivo, per verificare la sopravvivenza e la funzionalità cellulare, un'aliquota del campione viene stimolata con un anticorpo (Ab) diretto verso i recettori per le IgE ad alta affinità (FcεRI). Mimando l'allergene, questo anticorpo provoca il cross-link del recettore Fcε1 inducendo la stimolazione cellulare. Questo Ab anti recettore delle IgE si lega al dominio 1 della subunità α dei recettori ad alta affinità per le IgE indipendentemente dal fatto che questi siano liberi o complessati con IgE.

3. DOSAGGIO DEI LEUCOTRIENI: Il test ELISA prevede l'utilizzo di micropiastre precoattate. 16 pozzetti sono necessari ad ogni dosaggio per la curva standard ed i controlli. Per ogni paziente si utilizzano 2 pozzetti per il background, 2 pozzetti per la stimolazione di controllo e 2 pozzetti per ogni allergene. Il marcato enzimatico (fosfatasi alcalina) e l'Ab vengono aggiunti al supernatante cellulare, ai calibratori ed ai controlli; la piastra viene quindi incubata. Dopo un lavaggio, e l'aggiunto del substrato di pNPP (para-Nitrofenil-fosfato) la piastra viene incubata. Infine viene aggiunta ad ogni pozzetto la soluzione stoppante (2N NaOH) e la piastra letta mediante un lettore di micropiastre con filtro a 405 nm.

ITALIANO

SCOPO DEL DOSAGGIO

BÜHLMANN CAST®-2000 ELISA è un dosaggio quantitativo dei sulfoleucotrieni (sLT) prodotti da leucociti isolati da sangue periferico e stimolati con antigeni specifici. Il test può essere utilizzato anche per le reazioni allergiche nei cavalli. Il protocollo è disponibile su richiesta.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Con CAST®-2000 ELISA (1), i leucociti sedimentati dal sangue dei pazienti sono simultaneamente trattati con Interleuchina 3 (IL-3) e stimolati con allergeni (2).

I basofili sono tra le cellule coinvolte nella produzione di mediatori della flogosi allergica, fra i quali il sulfoleucotriene LTC₄, e i suoi metaboliti LTD₄ e LTE₄. La sintesi *de novo* del LTC₄ può essere sia IgE-mediata che non-IgE mediata; quest'ultimo evento è solitamente descritto come pseudo-allergia (3). La sintesi dei sLT neo formati dai basofili stimolati è misurata con un test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Il principio del dosaggio CAST®-ELISA è coperto da un brevetto (Patent No. US5,487,977). La procedura CAST®-2000 ELISA può essere distinta in tre parti:

1. ISOLAMENTO DEI LEUCOCITI: il destrano è aggiunto al sangue del paziente per aumentarne la viscosità. Durante un incubazione di 90 minuti a 18-28°C, gli eritrociti sedimentano, mentre i leucociti e i trombociti restano nella frazione plasmatica. Il supernatante viene trasferito in una nuova provetta; una breve centrifugazione provocherà la sedimentazione dei leucociti. Si elimina questo secondo supernatante, che contiene più del 90% dei trombociti ed il

REAGENTI FORNITI

REAGENTI PER L'ISOLAMENTO E LA STIMOLAZIONE DELLE CELLULE

Reagenti	Quantità		Codice	Ricostituzione
	EK-CAST	EK-CAST5		
Soluzione □ ospens senza conservanti	1 flacone 20 ml	2 flaconi 20 ml	B-CAST-DS	Pronto all'uso
Tampone di stimolazione senza conservanti	1 flacone liofil.	3 flaconi liofil.	B-CAST-STB	Aggiungere 50 ml d'acqua ultra-pure, apirogene.
Controllo di stimolazione Anticorpi anti-FcRI senza conservanti	1 flacone liofil.	2 flaconi liofil.	B-CAST-STCON	Aggiungere 3.5 ml d'acqua ultra-pure, apirogene.

Table 19

REAGENTI PER L'ELISA

Reagenti	Quantità		Codice	Ricostituzione
	EK-CAST	EK-CAST5		
Micropiastra precoattati con coniglio anti-topo IgG	2 pezzi: 12x8	5 pezzi: 12x8	B-CAST-MP	Lavasi una volta prima dell'uso
foglio sigillante	6 fogli	15 fogli		
Tampone di lavaggio concentrato (20X) con conservanti	1 flacone 50 ml	3 flaconi. 50ml	B-CAST-WB	Diluire con 950 ml d'acqua deionizzata
Tampone ELISA con conservanti	1 flacone 30 ml	1 flacone 80 ml	B-CAST-EB B-CAST5-EB ¹⁾	Pronto all'uso
Calibratore²⁾ LTD ₄ in un tampone su base proteica	5 x 1 flacone liofil.	8 x 1 flacone liofil.	B-CAST-CA ³⁾	Aggiungere 1 ml di acqua deionizzata
Controllo basso/alto⁴⁾ LTD ₄ in un tampone su base proteica	5 x 2 flaconi liofil.	8 x 2 flaconi liofil.	B-CAST-CONSET ⁵⁾	Aggiungere 1 ml di acqua deionizzata
Reagente bianco²⁾ LTD ₄ in un tampone su base proteica	1 flacone liofil.	1 flacone liofil.	B-CAST-BR	Aggiungere 2 ml di acqua deionizzata
Marcato	2 flaconi	3 flaconi	B-CAST-ELS	Aggiungere 5.5

enzimatico LTD ₄ coniugato ad aPase con conservanti	liofil.	liofil.	B-CAST-EL ¹⁾	ml (B-CAST-EL: 11 ml) di Tampone ELISA
Anticorpo anti-LTC ₄ /D ₄ /E ₄ in un tampone su base proteica, con conservanti	1 flacone 11 ml	1 flacone 27.5 ml	B-CAST-AS B-CAST5-AS ¹⁾	Pronto all'uso
Substrato di pNPP con granuli di stabilizzazione	1 flacone 42 ml	1 flacone 105 ml	B-CAST-PNPP B-CAST5-PNPP ¹⁾	Pronto all'uso
Soluzione stoppante 2 N NaOH	1 flacone 11 ml	1 flacone 27.5 ml	B-CAST-NAOH B-CAST5- NAOH ¹⁾	Pronto all'uso <i>Agente corrosivo</i>

Table 20

¹⁾ Codice EK-CAST5

²⁾ Dopo la ricostituzione, il calibratore contiene 3.200 pg/ml di LTD₄ ed il reagente bianco contiene 32.000 pg/ml di LTD₄.

³⁾ Confezione di set di calibratore: B-CAST-CA5 o -CA8; contiene: 5x o 8x B-CAST-CA

⁴⁾ I Controlli contengono quantità di LTD₄ lotto-specifica. Fare riferimento al foglio illustrativo dei QC per l'esatta concentrazione.

⁵⁾ Confezione di set di controllo: B-CAST-CONSET5 o -CONSET8; contiene: 5x o 8x B-CAST-CONSET

CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Kit integro	
Conservare a 2-8°C ad esclusione dei calibratori , del reagente bianco e dei controlli che devono essere conservati a -20°C o a temperature inferiori. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza	
Reagenti aperti/ricostituiti	
Soluzione destrano	Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta
Tampone di stimolazione	Stabile a -20°C per 6 mesi. Aliquotare per uso ripetuto
Controllo di stimolazione	Stabile a 2-8°C per 2 mesi. Per conservazione fino a 6 mesi aliquotare e congelare a -20°C
Micropiastra	Rimuovere dalla micropiastra le strip che non si intende utilizzare e assicurarsi che ogni pozzetto sia riempito almeno per metà dal tampone di conservazione. Aggiungere tampone tris (TBS) se non si dispone del tampone di conservazione. Coprire le strisce non utilizzate con gli appositi fogli adesivi forniti, riporle nell'involucro sigillandolo con l'apposita chiusura zip. Stabile per 6 mesi a 2-8°C.

Tampone di lavaggio	Stabile per 2 mesi a 2-8°C
Calibratore	Non riutilizzare
Controlli	
Reagente bianco	Stabile per 2 mesi a -20°C o a temperature inferiori. Aliquotare in caso d'utilizzo multiplo
Marcato enzimatico	Stabile per 2 mesi a 2-8°
Tampone ELISA	
Anticorpo	Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta
Substrato di pNPP	
Soluzione stoppante	Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta

Table 21

ALLERGENI E REAGENTI FORNITI A RICHIESTA

Reagenti	Quantità	Codice
Allergene ¹⁾ liofilizzato o pronto a diluire	1 flacone	consulta il listino degli allergeni www.buhlmannlabs.ch
C5a C5a umano ricombinato	1 flacone	BAG2-C5A-R

Table 22

¹⁾ **Allergeni proteici:** gli allergeni proteici BÜHLMANN sono sottoposti a controllo di qualità e forniti in forma liquida, concentrata (1µl/flacone); devono essere conservati refrigerati e diluiti prima dell'uso.

Farmaci ed allergeni chimici: gli allergeni BÜHLMANN a basso peso molecolare sono forniti in forma liofilizzata;

devono essere conservati refrigerati e ricostituiti prima dell'uso.

Per ulteriori informazioni consultare le istruzioni dell'uso degli allergeni BÜHLMANN ed i fogli illustrativi dei singoli allergeni sul sito: www.buhlmannlabs.ch.

ALLERGENI DA ALTRE FONTI

Gli allergeni da altre fonti possono essere utilizzati con CAST[®]2000-ELISA con le seguenti limitazioni:

- Gli allergeni devono essere senza matrice di legame (fase liquida o solida).
- La preparazione d'allergeni non deve contenere leucotrieni.
- La preparazione d'allergeni non deve contenere composti citotossici (stabilizzanti, preservanti) quali glicerolo, fenolo, sodio azide o mertiolato (thimerosal).

Richiedere le informazioni sulle procedure per l'utilizzo di questi allergeni ai distributori di zona o contattare la BÜHLMANN AG.

MATERIALE RICHIESTO NON FORNITO

- Pipette di precisione con puntali monouso: 10-100 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml.
- Pipette con puntali monouso: 25-1000 µl.
- Provette monouso di polipropilene per la separazione cellulare.
- Provette monouso di polipropilene o polistirene o suspensiones per colture tissutali per la stimolazione cellulare
- Cappa a flusso laminare per separazione cellulare e stimolazione (opzionale).
- Centrifuga refrigerata 130 – 1000 x g.
- *Acqua ultrapura, apirogena per i reagenti per la stimolazione cellulare.*
- Bagnetto riscaldato (o incubatore) a 37°C.
- Cilindri da 50 ml e da 1000 ml per la preparazione dei tamponi.
- Lavatore per suspensiones.
- Acqua distillata o deionizzata.
- Carta assorbente.
- Agitatore per micropiastra.
- Lettore per micropiastra (405 nm).

AVVERTIMENTI E PRECAUZIONI

REAGENTI CONTENENTI MATERIALE DI ORIGINE UMANA
Tutti i componenti di questo kit contengono albumina umana serica con l'eccezione della soluzione sospens, del substrato di pNPP et della soluzione stoppante. Ogni siero utilizzato nella preparazione dei componenti del kit è stato testato con un metodo approvato dalla FDA ed è risultato negativo per anticorpi HBV, HCV e HIV. Sebbene questi metodi siano estremamente accurati, non ci sono garanzie che questo materiale non possa trasmettere Epatite o AIDS. *Perciò, tutti i campioni dei pazienti e i componenti del kit dovrebbero essere trattati come potenzialmente infettivi.* Tutti i prodotti contenenti materiale di derivazione umana dovrebbero essere trattati secondo la buona pratica di laboratorio utilizzando precauzioni appropriate.

SUBSTRATO E SOLUZIONE STOPPANTE

Il tampone substrato contiene parnitrofenilfosfato (pNPP). La soluzione stoppante contiene sodio idrossido 2N. Questi reagenti sono irritanti per gli occhi, la pelle e le mucose. Evitare il contatto con gli occhi, cute e indumenti. Indossare guanti, indumenti ed occhiali protettivi. Dopo un contatto con occhi o cute, sciacquare immediatamente con abbondante acqua (*cf. Data Sheet Materiale di Sicurezza*).

RACCOLTA CAMPIONE E CONSERVAZIONE

I pazienti dovrebbero evitare l'assunzione di farmaci antiallergici quali antihistaminici, corticosteroidi o cromoglicato di sodio (DSCG) prima del prelievo. La sospensione del farmaco dipende da diversi fattori, come farmacocinetica, biodisponibilità della sostanza, durata e regime dell'amministrazione etc. Per evitare qualsiasi interazione con farmaci amministrati, BÜHLMANN raccomanda di sospendere l'amministrazione, se possibile, da tre a sette giorni prima del prelievo del sangue.

Pazienti sospetti di soffrire d'ipersensibilità ai farmaci non dovrebbero essere esaminati immediatamente dopo una reazione avversa da farmaco. Si raccomanda una fase di recupero di varie settimane dopo la reazione avversa. Diversi studi propongono di ottenere la sensibilità più alta del esame, testando il paziente dopo mezzo anno dalla reazione avversa al farmaco.

Importante: Campioni di sangue intero di pazienti che vengono provocati *in vivo* (e.g. provocazione orale o test cutanei) vengono prelevati prima di ogni esposizione con l'allergene.

Prelevare una quantità sufficiente di sangue intero in una provetta contenente EDTA. 200 µl di sangue intero sono necessarie per un tubo di reazione. Determinare la minima quantità di sangue necessaria seguendo la tabella:

No. di allergeni da testare	Quantità di sangue necessaria
1-5	2.0 ml
6-10	3.0 ml
11-15	4.0 ml
16-20	5.0 ml

Table 23

Importante:

- Effettuare la stimolazione cellulare **entro 24 ore** dal prelievo.
- Il campione di sangue dovrebbe essere refrigerato a **2-8°C**.
- Non centrifugare o congelare il sangue.

NOTE PROCEDURALI

PER I DOSAGGI CAST® ELISA È RACCOMANDATO L'UTILIZZO DI ACQUA DI QUALITÀ

Stimolazione cellulare: l'utilizzo di acqua *ultrapura*, *apirogena* per la ricostituzione dei reagenti di stimolazione cellulare (tampone di stimolazione e controllo di stimolazione) è essenziale per una buona e riproducibile stimolazione dei leucociti. Possono essere utilizzati i seguenti tipi di acqua: acqua per colture cellulari, acqua per soluzioni iniettabili, acqua bidistillata ultrafiltrata a 10kDa.

ELISA: tutti i reagenti devono essere ricostituiti con acqua deionizzata o bidistillata o, meglio, con la stessa qualità di acqua usata per la ricostituzione dei reagenti per la stimolazione cellulare.

PRECAUZIONI PER EVITARE LA CONTAMINAZIONE DEGLI ALLERGENI DURANTE LA STIMOLAZIONE CELLULARE.

Gli aeroallergeni presenti in laboratorio possono contaminare i campioni di sangue e le sospensioni cellulari causando un elevato livello basale di rilascio o una stimolazione falsamente positiva. È importante prestare molta attenzione alla chiusura dei campioni di sangue e delle provette per la stimolazione cellulare. Evitare la presenza di polveri, pollini e finestre aperte nel laboratorio dove avviene la stimolazione cellulare. *Si raccomanda di effettuare la preparazione delle cellule e le fasi di stimolazione sotto cappa a flusso laminare.*

DILUIZIONE CALIBRATORE

Ricostituire una nuova fialetta di calibratore e preparare una curva standard nuova per ogni dosaggio. I **calibratori** e **controlli** devono essere immediatamente utilizzati per il dosaggio ELISA perché, una volta ricostituiti e diluiti, **non sono stabili**.

Per ottenere una curva standard completa, preparare delle diluizioni seriali del calibratore:

- Etichettare tre provette S2 – S4 e dispensare in ognuna 300 µl di tampone ELISA.
- Dispensare 100 µl di calibratore ricostituito (S1, 3200 pg/ml) nella provetta S2, vortexare.
- Trasferire 100 µl da S2 a S3, vortexare.
- Trasferire 100 µl da S3 a S4, vortexare.

Le corrispondenti concentrazioni di sLT saranno:

S1:	3200 pg/ml	S4:	50 pg/ml
S2:	800 pg/ml	S0:	calibratore zero
S3:	200 pg/ml		(solo tampone ELISA)

PROCEDURA

STIMOLAZIONE CELLULARE

I volumi dei reagenti nelle fasi 1.- 4. dipendono dal volume dei campioni e devono essere determinati in base alla tabella sottostante:

Tabella volumi reagenti per stimolazione cellulare.		
campione sangue	destrano	tampone di stimolazione
1 ml	0.25 ml	1 ml
2 ml	0.50 ml	2 ml
3 ml	0.75 ml	3 ml

Table 24

I volumi dei punti 1.-8. della metodica seguente sono calcolati per 2 ml di campione di sangue da un singolo paziente, testato per un singolo allergene:

1. Dispensare 2 ml di sangue in una provetta di polipropilene, aggiungere 0.5 ml di destrano e vortexare gentilmente a bassa velocità.
2. Incubare per 90 minuti a 18-28°C.
3. Trasferire il supernatante in una seconda provetta e centrifugare per 15 minuti a 130 x g a 18-28°C.
4. Eliminare il supernatante e risospendere le cellule in 2 ml di tampone di stimolazione. *Procedere al punto 5 senza interruzione.*

Nota: L'incubazione al punto 5. può essere effettuata in piccole provette di polipropilene o polistirene o in micropiastre in polistirene non attivate. *La seguente procedura prevede l'uso di provette di polipropilene come esempio.* Se la sospensione cellulare ottenuta al punto 4. è sufficiente, i volumi al punto 5. possono essere raddoppiati. Questo permette di aliquotare e congelare il supernatante per dosare i campioni una seconda volta.

- 5a. Etichettare le provette per ogni paziente: PB (patient background = rilascio basale), PC (patient control = controllo positivo), A1 (allergene 1), e così via.
- 5b. Dispensare 50 µl di *tampone di stimolazione (background)* nella provetta PB di ogni paziente.
- 5c. Dispensare 50 µl di *controllo di stimolazione* nella provetta PC di ogni paziente.
- 5d. Dispensare 50 µl di *allergene* nella provetta corrispondente.
6. Dispensare 200 µl della sospensione cellulare di ogni paziente in tutte le provette corrispondenti.

7. Vortexare gentilmente, tappare le provette ed incubare per 40 minuti a 37°C.
8. Vortexare per dissolvere eventuali agglutinati. Centrifugare per 3 minuti a 1000 x g e 2-8°C. La refrigerazione è consigliata per ottenere un buon fondello cellulare e per prevenire la degradazione dei sLT. Trasferire con cura 2 x 100 µl di supernatante cellulare da ogni provetta (materiale da utilizzare nella fase 3e della procedura ELISA).

Importante: Procedere immediatamente con la procedura ELISA o conservare i supernatanti cellulari fino a 4 mesi a ≤-20°C.

PROCEDURA ELISA

1. Determinare il numero di strisce della micropiastra coattate con anticorpo di cattura necessarie per testare il numero desiderato di pazienti e allergeni più 16 pozzetti necessari per reagente bianco, curva di calibrazione e controlli.

Se non si utilizzano tutte le strisce contemporaneamente, rimuovere le strisce eccedenti della micropiastra e assicurarsi che ogni pozzetto sia riempito almeno a metà con tampone di conservazione. Utilizzare TBS (tampone tris) se non si ha abbastanza tampone di conservazione. Coprire le strisce che non si utilizzano con l'apposito foglio adesivo, riporle nell'involucro e conservarle refrigerate.

2. Svuotare i pozzetti dal tampone di conservazione. Lavare i pozzetti una volta con 300 µl di tampone di lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e decantare la piastra su carta assorbente per eliminare tutto il liquido.
- 3a. Dispensare 100 µl di reagente bianco in duplicato nei pozzetti A1+A2.
- 3b. Dispensare 100 µl di tampone ELISA (calibratore zero, S0) in duplicato nei pozzetti B1+B2.
- 3c. Dispensare 100 µl di calibratore S4 (50 pg/ml) in duplicato nei pozzetti C1+C2.
 Dispensare 100 µl di calibratore S3 (200 pg/ml) in duplicato nei pozzetti D1+D2.
 Dispensare 100 µl di calibratore S2 (800 pg/ml) in duplicato nei pozzetti E1+E2.
 Dispensare 100 µl di calibratore S1 (3200 pg/ml) in duplicato nei pozzetti F1+F2.
- 3d. Dispensare 100 µl di controllo a bassa concentrazione in duplicato nei pozzetti G1+G2.
 Dispensare 100 µl di controllo ad alta concentrazione in duplicato nei pozzetti H1+H2.
- 3e. Dispensare 100 µl di ogni supernatante cellulare in duplicato nei pozzetti successivi.
4. Dispensare 50 µl di marcato enzimatico in tutti i pozzetti.
5. Dispensare 50 µl d'anticorpo in tutti i pozzetti.
6. Coprire la piastra con l'apposito foglio adesivo ed incubare per 2 ore a 18-28°C su un agitatore a 800-1000 rpm.

Nota: In alternativa, incubare per 16-20 ore a 2-8°C

7. Rimuovere il foglio adesivo. Svuotare i pozzetti e lavarli tre volte con 300 µl di Wash Buffer per pozzetto. Svuotare i pozzetti e decantare la piastra su carta assorbente per eliminare tutto il liquido.

Importante: La soluzione di pNPP deve raggiungere la temperatura ambiente (18-28°C) prima dell'uso.

8. Dispensare 200 µl di soluzione di pNPP in tutti i pozzetti.
9. Coprire la piastra con il foglio protettivo, ed incubare per 30 minuti a 18-28°C su un agitatore a 800-1000 rpm; proteggere la piastra dall'esposizione diretta alla luce.
10. Rimuovere il foglio protettivo. Bloccare la reazione dispensando 50 µl di soluzione stoppante in tutti i pozzetti. Incubare brevemente sull'agitatore.
11. Leggere entro 30 minuti a 405 nm in un lettore di micropiastre.

CALCOLO DEI RISULTATI

GLOSSARIO

Massimo legame (MB, S0): assorbenza più elevata della procedura ELISA, usata per calcolare il valore percentuale di legame (B/B₀).

Bianco (NSB): assorbenza dell'aspecifico della procedura ELISA. Il valore è sottratto all'assorbenza del calibratore, del controllo e dei campioni.

CURVA DI CALIBRAZIONE

Riportare l'assorbenza a 405 nm per ogni calibratore, per il massimo legame (MB = S0) e per il bianco (NSB).

Calcolare la media dei duplicati dei valori, sottrarre la media del bianco (NSB) per ottenere l'assorbenza media corretta.

Calcolare il valore relativo alla coppia di pozzetti di ogni calibratore come percentuale del massimo legame, mediante l'assorbenza MB, corretta per il valore del NSB, presa come 100%:

$$B/B_0 (\%) = \text{percentuale di legame} = \frac{\text{assorbenza netta}}{\text{assorbenza MB netta}} \times 100$$

Riportare in un sistema di assi cartesiani la percentuale di legame (asse verticale) verso la concentrazione (pg/ml) in sLT dei calibratori (asse orizzontale) usando carta millimetrata semilogaritmica. Tracciare la migliore curva o calcolarla mediante equazione a quattro parametri.

CAMPIONI E CONTROLLI

Riportare il valore dell'assorbenza a 405 nm per ogni pozzetto di campioni e controlli.

Calcolare la media dei valori in duplicato e sottrarre la media del bianco (NSB) per ottenere l'assorbenza media corretta.

Calcolare il valore relativo alla coppia di pozzetti dei campioni e dei controlli come percentuale di massimo legame, mediante l'assorbenza MB, corretta per il valore del NSB, presa come 100%.

Leggere la concentrazione in sLT (pg/ml) dall'asse orizzontale per interpolazione del valore B/B₀ dei campioni e dei controlli.

NOTA: se la concentrazione iniziale di un campione sconosciuto è superiore a quella del calibratore più alto, il supernatante cellulare dovrebbe essere diluito con tampone ELISA e ridosato. La diluizione addizionale deve essere considerata nel calcolo della concentrazione finale dei sLT del campione.

VALORE DELLA STIMOLAZIONE

$$\text{Valore del controllo di stimolazione} = \frac{\text{concentrazione sLT}}{\text{(controllo di stimolazione)}} - \frac{\text{concentrazione sLT}}{\text{(background)}}$$

$$\text{Valore della stimolazione con allergene} = \text{concentrazione sLT (stimolazione con allergene)} - \text{concentrazione sLT (background)}$$

Per un esempio vedi Table 31 e Figure 1. I risultati e la curva standard sono forniti solo a scopo dimostrativo. Deve essere processata una curva standard per ogni gruppo di campioni da dosare.

CONTROLLO DI QUALITÀ DEL DOSAGGIO

Per verificare l'accurata esecuzione del test, è necessario rispettare i seguenti parametri di controllo di qualità:

- Assorbenza del bianco: < 200 mOD
- Dose stimata al 50% di legame (ED-50): 200-400 pg/ml di sLT
- Background dei pazienti: < 200 pg/ml di sLT
- Controllo di stimolazione: > 200 pg/ml di sLT (dopo sottrazione del background).

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

SIGNIFICATO DEL CONTROLLO DI STIMOLAZIONE

Sia in individui allergici che non allergici si dovrebbe ottenere un valore di controllo di stimolazione (dopo sottrazione del background) di almeno 200 pg/ml. Il controllo di stimolazione rappresenta la produzione di leucotrieni dovuta al legame a ponte dei recettori per le IgE ad alta affinità (Fc ϵ R1) dei basofili attraverso l'anticorpo diretto verso l'anti-recettore per le IgE. Il controllo di stimolazione può essere correlato alla densità di Fc ϵ R1 sui basofili dei pazienti ed alla loro releasability.

SIGNIFICATO DELLA STIMOLAZIONE CON ALLERGENE

Per **INALANTI** e **ALIMENTI** così come per il **LATTICE** e l' **α -AMYLASE**, i campioni con valore netto di stimolazione **MAGGIORE DI 200 pg/ml di sLT** dovrebbe essere considerato positivo per gli allergeni testati.

In un recente studio (4) il cut-off clinico per **L'APE** (BAG2-11) e **LA VESPA** (BAG2-13) è stato definito **270 pg/ml** con una zona grigia di 200-270 pg/ml.

A causa dello scarso aumento di rilascio di sLT con **FARMACI**, **ALLERGENI CHIMICI** e **ADDITIVI ALIMENTARI**, Bühlmann ha stabilito per ognuno di questi allergeni un **CUT-OFF TECNICO**. I valori sono stati ottenuti mediante il calcolo della media + 3SD della stimolazione netta di 20 campioni ottenuti da volontari sani (donatori di sangue). Tenendo conto delle variazioni inter-laboratorio e della precisione del dosaggio il cut-off è stato fissato a 40 pg/ml. I valori dei cut-off tecnici sono elencati nelli fogli illustrativi dei singoli allergeni (se recere al sito: www.buhmannlabs.ch)

Note:

- Bühlmann consiglia di usare una zona grigia includendo $\pm 20\%$ del cut-off tecnico.
- Per usare i cut-off tecnici, il test deve rientrare nei limiti di accettazione del controllo di qualità del EK-CAST.
- I valori di cut-off devono essere considerati come indicativi. Il cut-off clinico deve essere stabilito da ogni singolo laboratorio e da ulteriori studi.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Una completa comprensione della metodica è necessaria per l'uso ottimale del prodotto. Risultati attendibili si otterranno unicamente seguendo con precisione le procedure di laboratorio (linea guida GLP) e le istruzioni riportate in questa metodica.

Non essendo disponibili in commercio controlli per i sLT, si consiglia l'uso di pool di supernatanti cellulari contenenti differenti livelli di sLT come controllo di qualità interno (i supernatanti cellulari sono stabili fino a 4 mesi a -20°C). Tutti i controlli dovrebbero cadere all'interno dell'intervallo di confidenza per loro stabilito. Gli intervalli di confidenza

dei controlli della BÜHLMANN sono lotto-specifici e sono riportati su un foglio addizionale della metodica.

La riproducibilità dei parametri della curva standard e dei valori dei controlli dovrebbero rientrare nei limiti di accettabilità stabiliti dal laboratorio. Se la precisione del dosaggio non rispetta i limiti stabiliti e la ripetizione esclude eventuali errori tecnici, controllare: i) la precisione delle pipette, delle temperatura e dei tempi di reazione ii) l'impostazione del lettore ELISA iii) la scadenza dei reattivi iv) le condizioni di conservazione e incubazione v) che la Soluzione di pNPP sia incolore vi) la purezza dell'acqua.

LIMITE DEL DOSAGGIO

Un risultato CAST[®]-2000 ELISA negativo per un allergene non esclude la potenziale reazione clinica (anche severa) di un paziente. Pazienti con anamnesi positiva per reazioni avverse a farmaci con risultati CAST[®]-2000 ELISA negativi dovrebbero essere ulteriormente studiati, per esempio con test di provocazione *in vivo* o test cutaneo (ove appropriato) prima della somministrazione di ogni farmaco.

CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

CINETICA DELLA STIMOLAZIONE CELLULARE: Un esempio della cinetica della produzione dei sLT è riportato in (Figure 2). La cinetica può variare da un individuo all'altro; tuttavia, dopo 40 minuti di incubazione viene raggiunta una stimolazione stabile.

PRECISIONE INTRA SAGGIO DEL DOSAGGIO ELISA: 4,6%. La precisione intra saggio è stata calcolata mediante il risultato di 24 duplicati di ogni campione in una seduta. I valori di sLT sono espressi in pg/ml. (Table 32 **Intra-Assay Precision**).

PRECISIONE INTRA SAGGIO CUMULATIVA DELLA STIMOLAZIONE CELLULARE ED ELISA: 11,3%. la precisione intra saggio cumulativa è stata calcolata mediante 10 replicati della stimolazione cellulare per ogni campione in una singola seduta. I valori di sLT sono espressi in pg/ml (Table 33).

PRECISIONE INTER SAGGIO DEL DOSAGGIO ELISA: 15,4%. La precisione inter saggio è stata calcolata per ogni campione mediante il risultato di 20 duplicati in 20 sedute differenti. I valori di sLT sono espressi in pg/ml (Table 34).

SENSIBILITÀ ANALITICA DELL'ELISA: 19 PG/ML. La concentrazione minima dosabile di sLT è stata calcolata in 19 pg/ml sottraendo due deviazioni standard dalla media di 20 replicati del calibratore 0 (tampone ELISA, S0) ed interpolando questi valori con la curva standard ottenuta nella stessa seduta.

LINEARITÀ DELLE DILUIZIONI: 114,6%. Tre campioni diversi sono stati testati, dopo stimolazione, non diluiti o diluiti con tampone ELISA. I valori di sLT sono espressi in pg/ml (Table 35).

TEST DI RECUPERO: 99,5%. Tre campioni non stimolati sono stati processati prima e dopo l'aggiunta di diverse concentrazioni di sLTD₄. I valori di sLT sono espressi in pg/ml (Table 36).

SPECIFICITÀ: La crossreattività dell'anticorpo monoclonale utilizzato è stata stabilita al 50% del legame (Table 37).

VALORI ATTESI

La differenza della concentrazione nel campione stimolato con l'allergene rispetto all'aliquota di background (stimolato con il solo tampone di stimolazione) indica la releasability dei basofili del paziente.

La concentrazione di background determinata in 100 campioni di volontari sani ottenuti dalla Croce Rossa Svizzera, Basilea, è 20-140 pg/ml (2,5-9,7% percentile) e una stimolazione netta (controllo positivo) di 396- >3200 pg/ml sLT (cf. Table 38). Pazienti esposti all'allergene *in vivo* o atopici, specialmente quelli sensibilizzati al lattice,

possono avere un background più elevato di concentrazione di sLT. Tuttavia, è stata osservata nella maggior parte dei pazienti allergici concentrazione significativamente diferente fra il campione stimolato (controllo di stimolazione) e quello non stimolato (controllo negativo)

USO ESPECÍFICO

El ELISA CAST®-2000 de BÜHLMANN ha sido diseñado para realizar la determinación cuantitativa de sulfidoleucotrienos (sLT) producidos por leucocitos aislados después de contacto con antígenos específicos. El test puede también utilizarse para la determinación de reacciones alérgicas en caballos. El protocolo está disponible a demanda.

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

En el ELISA CAST®-2000 (1), leucocitos sedimentados de sangre del paciente se impregnan con Interleucina 3 (IL-3) y, simultáneamente, se estimulan con alérgenos (2). Las células basófilas, entre otras, generan el mediador alérgico, sulfidoleucotrieno LTC₄, y sus metabolitos LTD₄ y LTE₄. La formación *de novo* de LTC₄ puede ser dependiente o no de IgE. Este último caso se describe habitualmente como pseudoalergia (3). Estos sLT recién sintetizados se miden a continuación con una prueba ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). El principio del ELISA CAST® está protegido por una tecnología patentada (Patente N° US5.487.977).

El procedimiento del ELISA CAST®-2000 puede dividirse en tres partes:

1. AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS: Se añade dextrano a la sangre del paciente para incrementar su viscosidad. Después de 90 minutos a una temperatura de 18-28°C, los eritrocitos sedimentan, mientras que los leucocitos y trombocitos permanecen en la fracción de plasma. A continuación el sobrenadante de la sangre se traslada cuidadosamente a tubos separados y los leucocitos sedimentan en un breve paso de centrifugación. Se desecha el sobrenadante del plasma, que contiene >90% de los trombocitos, y el *pellet* de leucocitos se suspende de nuevo en el Tampón de Estimulación que contiene IL-3.

2. ESTIMULACIÓN CELULAR: Además del alérgico del interés se prueban las células de cada paciente para la liberación del nivel basal (= referencia) y para la liberación después de la estimulación con un anticuerpo antirreceptor de IgE (= control de estimulación). Las células se estimulan durante una incubación de 40 minutos a 37°C. Finalmente, se centrifugan y el sobrenadante celular se congela para el posterior almacenamiento o se prueba inmediatamente para la concentración de sLT en el ELISA. Como un control positivo que prueba la viabilidad y funcionalidad de las células, se estimula una tercera muestra de sangre del paciente con un anticuerpo (Ac) dirigido contra el receptor de IgE de alta afinidad (FcεRI). De manera similar a un alérgeno, este anticuerpo provoca el entrecruzamiento (*cross-linking*) del receptor I del Fcε y, por tanto, la estimulación de las células. Este anticuerpo antirreceptor de IgE se une al dominio 1 de la subunidad α del receptor de IgE de alta afinidad y es un anticuerpo no inhibidor. Así, se unirá al receptor sin importar si éste está libre u ocupado con IgE.

3. DETERMINACIÓN DE LEUCOTRIENOS: El ELISA se realiza utilizando placas de microtitulación recubiertas. Se utilizan 16 pocillos por ensayo para la curva estándar y los controles. Se utilizan dos pocillos por paciente para la referencia, dos pocillos por paciente para el control de estimulación y dos pocillos para cada alérgeno. Se añaden el Marcador enzimático (Fosfatasa alcalina=FA) y el Anticuerpo a los sobrenadantes celulares, así como a los estándares y a los controles, y se incuban. Después de un paso de lavado se añade la Solución de pNPP (para-

Nitrofenil-Fosfato = pNFF) a cada pocillo y se incuba. Finalmente se añade la solución de interrupción (NaOH 2N) a cada pocillo y se mide la absorbancia del color a 405 nm en un lector de placas de microtitulación.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

REACTIVOS PARA LA ISOLACIÓN Y STIMULACIÓN CELULAR

Reactivos	Cantidad		Código	Reconstitución
	EK-CAST	EK-CAST5		
Solución de dextrano sin conservantes	1 vial 20 ml	2 viales 20 ml	B-CAST-DS	Listo para usar
Tampón de estimulación sin conservantes	1 botella liofil.	3 bottelas liofil.	B-CAST-STB	Añadir 50 ml de agua ultra-pure, apyrogene
Controll de estimulación Anticuerpo anti-FcRI sin conservantes	1 vial liofil.	2 viales liofil.	B-CAST-STCON	Añadir 3.5 ml de agua ultra-pure, apyrogene

Table 25

REACTIVOS PARA EL ELISA

Reactivos	Cantidad		Código	Reconstitución
	EK-CAST	EK-CAST5		
Microplaca recubiertos con conejo anti ratón IgG	2 unidades 12x8	5 unidades 12x8	B-CAST-MP	lávase una vez antes de uso
Sellador de placas	6 unidades	15 unidades		
Tampón de lavado concentrado (20X) con conservantes	1 bottela 50 ml	3 bottelas 50ml	B-CAST-WB	Diluir con 950 ml de agua desionizada
Tampón ELISA con conservantes	1 bottela 30 ml	1 bottela 80 ml	B-CAST-EB B-CAST5-EB ¹⁾	Listo para usar
Calibrador²⁾ LTD ₄ en un tampon de proteínas	5 x 1 vial liofil.	8 x 1 vial liofil.	B-CAST-CA ³⁾	Añadir 1 ml de agua desionizada
Controll bajo/alto⁴⁾ LTD ₄ en un tampon de proteínas	5 x 2 viales liofil.	8 x 2 viales liofil.	B-CAST-CONSET ⁵⁾	Añadir 1 ml de agua desionizada
Reactivo blanco²⁾ LTD ₄ en un tampon de proteínas	1 vial liofil.	1 vial liofil.	B-CAST-BR	Añadir 2 ml de agua desionizada
Marcador enzimático LTD ₄ conjugado a aPase con conservantes	2 viales liofil.	3 viales liofil.	B-CAST-ELS B-CAST-EL ¹⁾	Añadir 5.5 ml (B-CAST-EL: 11 ml) de Tampón ELISA
Anticuerpo Anti-sLT de ratón en tampon, de proteínas, con conservantes	1 vial 11 ml	1 vial 27.5 ml	B-CAST-AS B-CAST5-AS ¹⁾	Listo para usar
Substrato de pNPP con granulas estabilizantes	1 bottela 42 ml	1 bottela 105 ml	B-CAST-PNPP B-CAST5-PNPP ¹⁾	Listo para usar
Solution de parada 2 N NaOH	1 vial 11 ml	1 vial 27.5 ml	B-CAST-NAOH B-CAST5-NAOH ¹⁾	Listo para usar <i>Agente corrosivo</i>

¹⁾ Código de pedido para EK-CAST5 Table 26

²⁾ Después de la reconstitución el Calibrador contiene 3200 pg/ml de LTD₄ y el Reactivo Blanco contiene 32'000 pg/ml de LTD₄, respectivamente.

³⁾ Conjunto de reactivos del set de calibrador: B-CAST-CA5 o -CA8; contenido: 5x o 8x B-CAST-CA

⁴⁾ Los Controles contienen cantidades específicas del lote de LTD₄. Consulte la hoja de datos de control de calidad adicional para las concentraciones exactas.

⁵⁾ Conjunto de reactivos del set de controll: B-CAST-CONSET5 o -CONSET8; contenido: 5x o 8x B-CAST-CONSET

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Kit sin abrir	
Almacénesse a 2-8°C excepto Calibradores, Reactivos Blancos y Controles , que deben almacenarse a -20°C o menos. No utilice el kit pasada la fecha de caducidad.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Solución de dextrano	Almacénesse a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas
Tampón de estimulación	Estable a -20°C durante 6 meses. Hacer alícuotas si se espera repetir el uso.
Control de estimulación	Estable a 2-8°C durante 2 meses. Para almacenamientos más largos hacer alícuotas y congelar a -20°C hasta 6 meses.

Microplaca	Retire las tiras sin utilizar del soporte y asegúrese de que cada pocillo esté lleno como mínimo hasta la mitad con el tampón de almacenamiento. Añada solución salina tamponada con Tris (TBS) si se ha perdido demasiado tampón de almacenamiento. Cubra estas tiras sobrantes con un sellador de placas, guárdelas en la bolsa metalizada y vuelva a cerrarla completamente por toda la cremallera. Almacénesse hasta 6 meses a 2-8°C.
Tampón de lavado	Almacénesse hasta 2 meses a 2-8°C
Calibrador	No almacenar
Controles	
Reactivo blanco	Almacénesse a -20°C o menos hasta 2 meses. Alícuota si se espera repetir el uso
Marcador enzimático	Almacénesse hasta 2 meses a 2-8°C
Tampón ELISA	Almacénesse a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas
Anticuerpo	
Solución de pNPP	
Solución de interrupción	Almacénesse a 18-28°C. O a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas

Table 27

ALERGENOS Y REACTIVOS SUMINISTRADOS A PETICIÓN

Reactivo	Cantidad	Código
Allergen¹⁾ liofilizado o listo para diluir	1 vial	Vea CAST Allergens (www.buhlmannlabs.ch)
C5a C5a humano recombinado	1 vial	BAG2-C5A-R

Table 28

¹⁾ **Allergenos de proteínas:** Los alérgenos de proteína BÜHLMANN tienen control de calidad y se envían en forma líquida concentrada (1µl/vial). Los alérgenos de proteínas tienen que almacenarse refrigerados y deben diluirse antes de su uso.

Allergenos de fármacos y productos químicos: Los alérgenos de bajo peso molecular BÜHLMANN se envían en forma liofilizada. Los alérgenos de bajo peso molecular tienen que almacenarse refrigerados y deben reconstituirse antes de su uso.

Para informarse sobre el uso de los alérgenos, consulte al **foletto de alérgenos** al sitio web: www.buhlmannlabs.ch.

REACTIVOS DE ALERGENOS DE OTRAS FUENTES:

En el ELISA CAST®-2000 se pueden utilizar alérgenos de otras fuentes con las siguientes limitaciones:

- No deben utilizarse alérgenos unidos a matriz (fase sólida o líquida).
- No deben utilizarse preparaciones de alérgenos que contengan leucotrienos.
- No deben utilizarse preparaciones de alérgenos que contengan compuestos citotóxicos (estabilizantes, conservantes) como glicerol, fenol, azida sódica o mertiolato (timerosal).

Para informarse sobre el procedimiento para probar alérgenos específicos del cliente con los Ensayos CAST® consulte a su distribuidor local o contacte con BÜHLMANN.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión ajustable con puntas desechables: 10-100 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml.
- Pipeta ajustable con puntas desechables: 25-1000 µl.
- Tubos desechables de polipropileno para la separación celular.
- Tubos desechables de poliestireno o polipropileno y placas de microtitulación para cultivo tisular para la estimulación celular, respectivamente.

- Flujo laminar para la separación celular y la estimulación (opcional).
- Centrifuga refrigerada a 130 - 1000 x g.
- *Agua ultrapura, apirogénica, para los reactivos de la estimulación celular.*
- Baño de agua (o estufa) dispuesto a 37°C.
- Cilindros de 50 ml y 1000 ml para la preparación del tampón.
- Dispositivo automático de lavado y aspiración de placas de microtitulación.
- Agua destilada o desionizada.
- Papel secante.
- Agitador de placas de microtitulación.
- Lector de placas de microtitulación (405 nm).

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

REACTIVOS QUE CONTIENEN MATERIAL DE ORIGEN HUMANO

Todos los componentes de este kit contienen albúmina de suero humano a excepción del solución de dextrano, de sustrato de pNPP y de solución de parada. Todas las unidades donadas de suero usadas en la preparación de los componentes del kit han sido analizadas por un método aprobado por la FDA, dando resultados negativos para los anticuerpos a VHB, VHC y VIH. Aunque estos métodos son extremadamente exactos, no se garantiza que este material no pueda transmitir hepatitis o SIDA. *Por consiguiente, todas las muestras de pacientes y todos los componentes del kit deben ser manipulados como si fueran susceptibles de transmitir infecciones.* Todos los productos que contengan material de origen humano deben ser manipulados de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio tomando las precauciones adecuadas.

SOLUCIÓN DI PNPP Y DE INTERRUPCIÓN

La Solución di pNPP contiene para-nitrofenil-fosfato (pNFF). La solución de interrupción contiene hidróxido sódico 2N. Los dos reactivos pueden irritar los ojos, la piel y las membranas mucosas. Evite el contacto con los ojos, la piel y la ropa. Utilice ropa protectora adecuada, guantes y protección ocular. Después del contacto con los ojos o la piel lave inmediatamente con agua abundante. (cf. Hoja de Datos de Seguridad del Material).

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Es recomendable que los pacientes eviten los fármacos antialérgicos de administración sistémica, como antihistamínicos, corticoesteroides o ácido cromoglicólico (DSCG) antes de tomar la muestra de sangre.

La suspensión de fármacos depende de diversos factores, tales como la farmacocinética, biodisponibilidad de sustancias, duración y el régimen de administración etc.. Para evitar cualquier interacción con fármacos administrados, Bühlmann recomienda parar la administración, si es posible, tres a siete días antes de la colección de las muestras de sangre.

Los pacientes supuestos sufrir de hipersensibilidad de fármacos no deben ser probados para la droga inmediatamente después de una reacción adversa. Se recomienda una fase de recuperación de varias semanas después de una reacción adversa. Diversos estudios proponen alcanzar la sensibilidad más alta del análisis probando al paciente en aproximadamente mitad del año después de una reacción adversa a las drogas

Importante: Las muestras de la sangre de los pacientes que van a ser in vivo probado como prueba de la piel o el provocation oral, se deben dibujar antes de cualquier exposición al alérgico.

Recoja suficiente sangre en tubos de venipunción con EDTA. 200 µl de sangre entera son necesarios por el tubo de la reacción. Determine la cantidad necesaria de sangre de acuerdo con la siguiente tabla:

N.º de alérgenos que se va a probar	Sangre necesaria
1-5	2,0 ml
6-10	3,0 ml
11-15	4,0 ml
16-20	5,0 ml

Table 29

Importante:

- Realice la estimulación celular en las **24 horas** posteriores a la recogida de sangre.
- La muestra de sangre debe refrigerarse a **2-8°C**.
- No centrifugue ni congele la sangre.

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO

CALIDAD RECOMENDADA DEL AGUA PARA EL CAST®-ELISA

Estimulación celular: Para conseguir una estimulación leucocitaria buena y reproducible es esencial utilizar *agua ultrapura apirogénica* en la reconstitución de los reactivos de estimulación celular (tampón de estimulación y control de estimulación). Se puede utilizar agua de los siguientes tipos: Agua para cultivo celular, agua para infusión o agua bidestilada y desionizada que se ultrafiltre con un ultrafiltro de 10 kDa saneado periódicamente.

ELISA: Todos los reactivos deben reconstituirse con agua desionizada o bidestilada o con la misma calidad del agua que se utilice para los reactivos de estimulación celular.

PRECAUCIONES PARA EVITAR LA CONTAMINACIÓN CON ALERGENOS DURANTE LA ESTIMULACIÓN CELULAR

Los aeroalérgenos del laboratorio pueden contaminar las muestras de sangre y las suspensiones celulares abiertas de los pacientes, con lo que podrían causar una elevada liberación de referencia o una estimulación falsamente positiva. Por tanto, se debe tener cuidado en cubrir las muestras de sangre y los tubos de estimulación celular. Evite que haya ácaros del polvo doméstico, plantas polinizadoras y ventanas abiertas en el laboratorio donde se lleve a cabo la estimulación celular. *Recomendamos que la preparación celular y los pasos de la estimulación se realicen en una campana de laboratorio con flujo laminar.*

DILUCIÓN DEL CALIBRADOR

Reconstituya un nuevo vial del calibrador y prepare una curva estándar nueva cada vez que se realice un nuevo ensayo. Los calibradores y los controles reconstituidos y diluidos no son estables y deben utilizarse en el ELISA sin demora.

Para obtener una curva estándar completa se preparan diluciones en serie del calibrador del modo siguiente:

- Etiquete tres tubos S2 a S4 y pipetee 300 µl del tampón de ELISA en los tubos S2 a S4.
- Pipetee 100 µl de calibrador reconstituido (S1, 3200 pg/ml) en el tubo S2 y agite con el vortex.
- Transfiera 100 µl de S2 a S3, agite con el vortex. Transfiera 100 µl de S3 a S4, agite con el vortex.

Las concentraciones correspondientes de sLT serán:

S1:	3200 pg/ml	S4:	50 pg/ml
S2:	800 pg/ml	S0:	Calibrador cero
S3:	200 pg/ml		(sólo tampón de ELISA)

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

ESTIMULACIÓN CELULAR

Los volúmenes de los reactivos en los pasos 1 a 4 dependen del volumen de la muestra y deben determinarse de acuerdo con la tabla siguiente:

Tabla de volúmenes para los reactivos de estimulación celular		
Muestra de sangre	Solución de dextrano	Tampón de estimulación
1 ml	0,25 ml	1 ml
2 ml	0,50 ml	2 ml
3 ml	0,75 ml	3 ml

Table 30

Los volúmenes de los pasos 1 a 8 están calculados como un ejemplo a partir de un volumen de la muestra de sangre de 2 ml de un único paciente probado para un único alérgeno:

1. Pipetee 2 ml de sangre en un tubo de polipropileno, añada 0,5 ml de solución de dextrano y agite con el vortex suavemente a baja velocidad.
2. Incube durante 90 minutos a 18-28°C.
3. Transfiera la fase superior a un segundo tubo y centrifúguelo durante 15 minutos a 130 x g y 18-28°C.
4. Deseche el sobrenadante y suspenda de nuevo las células en 2 ml de tampón de estimulación. *Pase al paso 5 sin interrupción.*
Notas: La incubación del paso 5 puede realizarse en tubos pequeños de polipropileno o poliestireno y en placas de microtitulación de poliestireno no activadas, respectivamente. *El siguiente procedimiento utiliza tubos de polipropileno en el paso 5 como ejemplo.* Si se dispone de una suspensión celular suficiente del paso 4 se pueden doblar los volúmenes en el paso 5. Esto permite hacer alícuotas y congelar los sobrenadantes para ensayar las muestras finalmente una segunda vez.
- 5a. Etiquete los tubos de cada paciente: RP (referencia del paciente), CP (control del paciente), A1 (alérgeno 1), etc.
- 5b. Pipetee 50 µl de *tampón de estimulación (referencia)* en el tubo RP de cada paciente.
- 5c. Pipetee 50 µl de *control de estimulación* en el tubo CP de cada paciente.
- 5d. Pipetee 50 µl de *alérgeno* en los tubos correspondientes del paciente.
6. Pipetee 200 µl de suspensión celular de cada paciente en los tubos correspondientes.
7. Agite con el vortex suavemente, tape los tubos e incube durante 40 minutos a 37°C.
8. Agite con el vortex para disolver los aglutinados. Centrifugue durante 3 minutos a 1000 x g y 2-8°C. Se recomienda la refrigeración para obtener un *pellet* firme y prevenir la degradación del sLT. Pipetee cuidadosamente 2 x 100 µl del sobrenadante celular de cada tubo para utilizarlos en el paso 3e del procedimiento del ELISA.

Importante: Pase inmediatamente al procedimiento del ELISA o almacene los sobrenadantes celulares hasta 4 meses a ≤-20°C.

PROCEDIMIENTO DEL ELISA

1. Determine el número de tiras de la Microplaca recubierta de anticuerpo de captura necesarias para probar el número de pacientes y alérgenos deseados más 16 pocillos necesarios para el reactivo blanco, el calibrador y los controles.

Si no utiliza todas las tiras de una sola vez, retire las tiras sin utilizar del soporte y asegúrese de que cada pocillo esté lleno como mínimo hasta la mitad con el tampón de almacenamiento. Añada solución salina tamponada con Tris (TBS) si se ha perdido demasiado tampón de almacenamiento. Cubra estas tiras sobrantes con el sellador de placas y almacénelas refrigeradas.

2. Vacíe los pocillos recubiertos llenos de tampón de almacenamiento. Lave una vez los pocillos recubiertos utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
 - 3a. Pipetee 100 µl de reactivo blanco por duplicado en los pocillos A1+A2.
 - 3b. Pipetee 100 µl de tampón de ELISA (Calibrador cero, S0) por duplicado en los pocillos B1+B2.
 - 3c. Pipetee 100 µl de calibrador S4 (50 pg/ml) por duplicado en los pocillos C1+C2.
Pipetee 100 µl de calibrador S3 (200 pg/ml) por duplicado en los pocillos D1+D2.
Pipetee 100 µl de calibrador S2 (800 pg/ml) por duplicado en los pocillos E1+E2.
Pipetee 100 µl de calibrador S1 (3200 pg/ml) por duplicado en los pocillos F1+F2.
 - 3d. Pipetee 100 µl del control bajo por duplicado en los pocillos G1+G2.
Pipetee 100 µl del control alto por duplicado en los pocillos H1+H2.
 - 3e. Pipetee 100 µl de cada sobrenadante celular por duplicado en los siguientes pocillos.
4. Añada 50 µl de Marcador enzimático a todos los pocillos.
5. Añada 50 µl de anticuerpo a todos los pocillos.
6. Cubra la placa con un sellador de placa, coloque la placa en un agitador de placas ajustado a 800-1000 rpm e incube durante 2 horas a 18-28°C.
Nota: Alternativamente, incube la placa durante 16-20 horas a 2-8°C.
7. Retire el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos tres veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Sacuda la placa firmemente en papel secante.
Importante: Deje que la Solución de pNPP alcance 18-28°C antes de utilizarla.
8. Añada 200 µl de la Solución de pNPP a todos los pocillos.
9. Cubra la placa con un sellador de placas, coloque la placa en un agitador de placas ajustado a 800-1000

rpm, proteja la placa de la luz directa e incube durante 30 minutos a 18-28°C.

10. Retire el sellador de placa. Detenga la reacción añadiendo 50 µl de solución de interrupción a todos los pocillos. Mezcle brevemente con el agitador de placas de microtitulación.

11. Lea la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de microtitulación al cabo de un máximo de 30 minutos.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

GLOSARIO

Máxima unión (MB, S₀): Absorción máxima técnica del ELISA utilizada para el cálculo de los valores correspondientes del porcentaje unido (B/B₀).

Blanco (NSB): Absorción no específica técnica del ELISA. El valor se resta de las absorciones del calibrador, el control y la muestra.

CURVA ESTÁNDAR

Registre la absorbancia a 405 nm para cada pocillo del calibrador, máxima unión (MB = S₀) y blanco (NSB).

Calcule el promedio de los valores duplicados, résteles el promedio de los pocillos del blanco (NSB) y registre los promedios (= absorbancia media corregida).

Calcule la unión de cada par de pocillos del calibrador como un porcentaje de la máxima unión, considerando la absorbancia del MB corregida por el NSB como el 100%:

$$B/B_0 (\%) = \text{porcentaje unido} = \frac{\text{absorbancia neta}}{\text{absorbancia neta del MB}} \times 100$$

Represente el porcentaje unido (eje vertical) frente a la concentración de sLT en picogramos/ml de los calibradores (eje horizontal) utilizando un papel gráfico semilogarítmico. Dibuje la mejor curva de ajuste o calcule la curva estándar utilizando un algoritmo de cuatro parámetros.

MUESTRAS Y CONTROLES

Registre la absorbancia a 405 nm para cada pocillo de las muestras y de los controles.

Calcule el promedio de los valores duplicados, résteles el promedio de los pocillos del blanco y registre los promedios (= absorbancia media corregida).

Calcule, como se ha descrito anteriormente, la unión de cada par de pocillos de las muestras y de los controles como un porcentaje de la máxima unión, considerando la absorbancia del MB corregida por el NSB como el 100%.

Lea la concentración de sLT (pg/ml) del eje horizontal por interpolación del valor B/B₀ de las muestras y de los controles.

NOTA: Si la concentración inicial de una muestra desconocida es mayor que el calibrador más alto, el sobrenadante celular debe diluirse con tampón de ELISA y ensayarse de nuevo según el procedimiento del ensayo. La dilución adicional debe considerarse cuando se calcule la concentración de sLT presente en la muestra desconocida.

PRODUCTO DE LA ESTIMULACIÓN

$$\begin{array}{l} \text{Producto del control de} \\ \text{estimulación} \end{array} = \begin{array}{l} \text{concentración de sLT} \\ \text{(control de estimulación)} \end{array} - \begin{array}{l} \text{concentración de sLT} \\ \text{(referencia)} \end{array}$$
$$\begin{array}{l} \text{Producto de la} \\ \text{estimulación con} \\ \text{alergeno} \end{array} = \begin{array}{l} \text{concentración de sLT} \\ \text{(estimulación con} \\ \text{alergeno)} \end{array} - \begin{array}{l} \text{concentración de sLT} \\ \text{(referencia)} \end{array}$$

Para un Ejemplo de Resultados típicos véase la Figura 1. Estos resultados y la curva estándar se ofrecen únicamente con propósitos de demostración. Se debe generar una curva estándar para cada conjunto de muestras que se ensaye.

CONTROL DE CALIDAD DEL ENSAYO

Para verificar un funcionamiento correcto de la prueba es indispensable realizar un seguimiento de los siguientes parámetros de control de calidad:

- Lectura DO del blanco del ensayo: < 200 mOD
- Dosis estimada en el 50% de unión (ED-50): 200-400 pg/ml de sLT
- Nivel de referencia del paciente: < 200 pg/ml de liberación de sLT
- Nivel de control de estimulación: > 200 pg/ml de liberación de sLT (después de restar la referencia).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

INTERPRETACIÓN DEL CONTROL DE ESTIMULACIÓN

Tanto en individuos alérgicos como en no alérgicos debe esperarse un producto neto del control de estimulación (después de restarle la referencia) de como mínimo 200 pg/ml utilizando el control de estimulación. El control de estimulación representa la producción de leucotrienos debida al entrecruzamiento (*cross-linking*) de los receptores de IgE de alta afinidad (Fcε RI) de los basófilos por un anticuerpo antirreceptor de IgE. El control de estimulación puede correlacionarse con la densidad de FcεRI de los basófilos del paciente y la capacidad de liberación de los mismos.

INTERPRETACIÓN DE LA ESTIMULACIÓN CON ALERGENO

Para los **ALERGENOS POR INHALACIÓN** y **ALIMENTARIOS**, así como para el **LÁTEX** y l'**α-AMYLASE**, proponemos que los individuos con un producto de estimulación neta **SUPERIOR A 200 pg/ml de sLT** deben considerarse positivos para el alérgeno probado.

Según un estudio reciente (4), el valor de corte clínico del **VENENO DE LA ABEJA** (BAG2-I1) y de la **AVISPA** (BAG2-I3) se ha definido a **270 pg/ml** y la zona gris se ha fijado a 200 a 270 pg/ml.

Debido al reducido aumento de la liberación de sLT con los **ALERGENOS DE FÁRMACOS, ALERGENOS QUÍMICOS y ADITIVOS ALIMENTARIOS**, Bühlmann estableció para cada alérgeno un VALOR DE CORTE TÉCNICO INDIVIDUAL. Los valores representan la media + 3DE de la estimulación neta de hasta 20 muestras estimuladas de donantes de sangre normales. Debido a la variación entre laboratorios y a la precisión del ensayo, los valores de corte no son inferiores a 40 pg/ml. En los **foletos de alérgenos** al sitio web se listan los valores de corte técnicos (www.buhmannlabs.ch).

Notas:

- BÜHLMANN recomienda de utilizar una zona gris incluyendo una gama de +/-20% de los valores de corte individuales.
- Para aplicar los valores de corte técnicos y individuales los datos del control de calidad del EK-CAST deben ser satisfechos.
- Estos valores deben utilizarse únicamente a modo orientativo. Debe establecerse un valor de corte clínicamente relevante por cada laboratorio y por estudios adicionales, respectivamente.

CONTROL DE CALIDAD

Es necesaria una completa comprensión de este prospecto para que el uso del producto dé unos resultados satisfactorios. Sólo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (guías de Buenas Prácticas de Laboratorio actuales) y siguiendo cuidadosamente este prospecto.

Dado que no hay controles para sLT disponibles comercialmente, recomendamos el uso de reservas de sobrenadantes celulares que contengan diferentes niveles

de sLT para los controles de calidad internos (los sobrenadantes celulares son estables hasta 4 meses a – 20°C). Todos los controles deben encontrarse dentro de los límites de confianza establecidos. Los límites de confianza para los controles de sLT sintético de BÜHLMANN son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos de control de calidad.

La reproducibilidad de los parámetros de la curva estándar y de los valores de control debe encontrarse dentro de los límites establecidos de aceptabilidad del laboratorio. Si la precisión del ensayo no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye errores de la técnica, compruebe los siguientes aspectos: i) instrumentos de pipeteado, control de temperatura y tiempo ii) ajustes del lector de ELISA iii) fechas de caducidad de los reactivos iv) condiciones de almacenamiento e incubación v) la Solución de pNPP debe ser incolora vi) pureza del agua.

VALORES ESPERADOS

La diferencia de la concentración de sLT en la muestra estimulada con el alérgeno comparada con la muestra de referencia (estimulada únicamente con el tampón de estimulación) muestra la capacidad de liberación de los basófilos del paciente. La concentración de referencia determinada en 100 donantes del Centro de la Cruz Roja Suiza, Basilea, fue de 20-140 pg/ml (percentiles 2,5-97,5%) y una estimulación neta (controllo positivo) de 396->3200 pg/ml sLT (ver Table 38). Sin embargo, los pacientes expuestos al alérgeno *in vivo* o los pacientes atópicos, en particular los pacientes sensibles al látex, pueden mostrar valores de referencia de sLT mucho más altos. No obstante, aún se observó una diferencia significativa entre las muestras estimuladas (control de estimulación) y las no estimuladas (control negativo) en la mayoría de los casos de pacientes alérgicos.

LIMITACIONES

Un resultado negativo del ELISA CAST® -2000 para un alérgeno específico no puede excluir la potencial aparición de una reacción clínica (incluso grave) en un paciente. Por tanto, los pacientes con antecedentes de reacciones adversas a un alérgeno de fármacos con un resultado negativo del ELISA CAST®-2000 deben seguirse con un método adicional, como una provocación *in vivo* o una prueba de punción de la piel (si está indicada), antes de que se administre cualquier fármaco.

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

CINÉTICA DE LA ESTIMULACIÓN CELULAR: Se da un ejemplo de la cinética de la producción de sLT. La cinética puede diferir de un individuo a otro. Sin embargo, se alcanza una estimulación estable después de 40 minutos de incubación.

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO DEL ELISA (DENTRO DE LA PRUEBA): 4,6%. La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 24 pares de valores obtenidos de cada muestra en una única prueba. Los valores se presentan como pg/ml de sLT.

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO DE LA ESTIMULACIÓN CELULAR Y EL ELISA COMBINADOS: 11,3%. Los estadísticos se calcularon a partir de los resultados de 10 repeticiones de la estimulación celular de cada muestra en una única prueba. Los valores se presentan como pg/ml de sLT.

PRECISIÓN INTER-ENSAYO DEL ELISA (PRUEBA A PRUEBA): 15,4%. La precisión inter-ensayo se calculó para cada muestra a partir de los resultados de 20 pares de valores en 20 pruebas diferentes. Los valores se presentan como pg/ml de sLT.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA DEL ELISA: 19 pg/ml. La dosis mínima detectable de sLT se calculó en 19 pg/ml al restar 2 DE de la media de 20 repeticiones del calibrador cero (tampón de ELISA, S0) y calculando la intersección de este valor con la curva estándar obtenida en la misma prueba.

LINEALIDAD DE LA DILUCIÓN: 114,6%. Se ensayaron muestras de tres pacientes después de la estimulación celular sin diluir o diluidas con el tampón de ELISA. Los valores se presentan como pg/ml de sLT.

RECUPERACIÓN DEL SPIKING: 99,5%. Se ensayaron tres muestras de pacientes sin estimular antes y después del *spiking* con cantidades variables de sLT D₄. Los valores se presentan como pg/ml de sLT.

ESPECIFICIDAD: Se determinaron las reactividades cruzadas del anticuerpo monoclonal utilizado al 50% de unión.

APPENDIX I:

TABLES/ TABELLEN/ TABLES/ TABELLE/ TABLAS

Table 31

Typical Data

	Conc. (pg/ml)	Absorbance (OD)	B/B ₀ (%)	Calc. Conc. (pg/ml)	CV Conc. (%)
Blank		0.146			
Blank		0.156			
Blank Avg.		0.151			4.7
Cal S0	0	1.327	100.0		
Cal S0	0	1.303	100.0		
Cal S0 Avg.	0	1.315	100.0		1.3
Cal S4	50	1.146	85.5	51	
Cal S4	50	1.155	86.3	49	
Cal S4 Avg.	50	1.151	85.9	50	3.6
Cal S3	200	0.829	58.2	195	
Cal S3	200	0.812	56.8	205	
Cal S3 Avg.	200	0.821	57.5	200	3.9
Cal S2	800	0.385	20.1	793	
Cal S2	800	0.381	19.8	807	
Cal S2 Avg.	800	0.383	19.9	800	1.2
Cal S1	3200	0.202	4.4	3455	
Cal S1	3200	0.213	5.3	2966	
Cal S1 Avg.	3200	0.208	4.9	3200	10.8
Ctrl. LOW		1.069		76	
Ctrl. LOW		1.050		83	
Ctrl. L. Avg.		1.059		80	6.2
Ctrl. HIGH		0.629		356	
Ctrl. HIGH		0.612		374	
Ctrl. H. Avg.		0.620		365	3.5
Background		1.185		40	
Background		1.153		49	
Backgr. Avg.		1.169		45	14.3
Stim. Control		0.295		1282	
Stim. Control		0.299		1248	
Stim. Ctrl Avg.		0.297		1265	1.9
Allergen		0.474		572	
Allergen		0.490		543	
Allergen Avg.		0.482		557	7.6

ED-20 = 797 pg/ml ED-50 = 262 pg/ml ED-80 = 71 pg/ml

Figure 1 Standard Curve

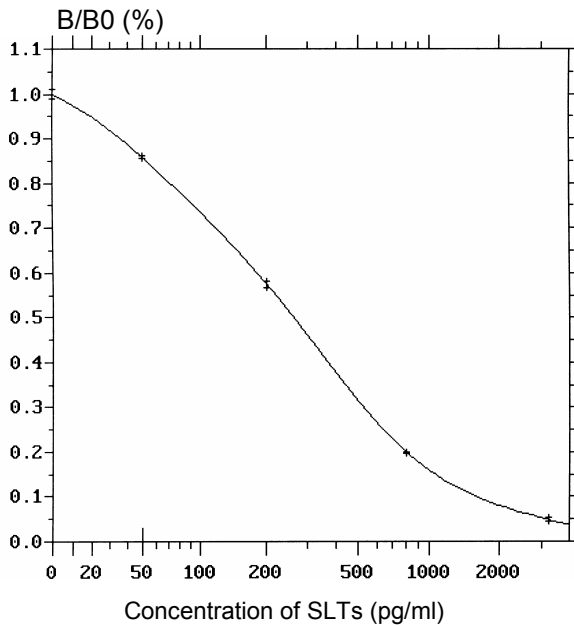


Figure 2 Kinetics of cell stimulation

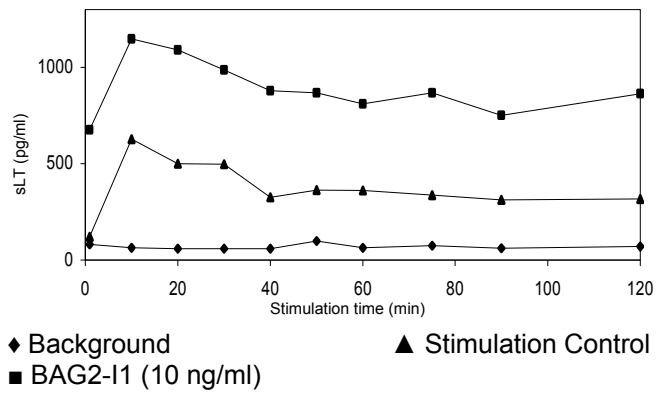


Table 32 Intra-Assay Precision

Sample #	Mean	SD	% CV
1	54	3.9	7.3
2	221	9.6	4.4
3	467	13.9	3.0
4	592	22.3	3.8
5	1308	44.5	3.4
6	1752	94.9	5.4
Mean			4.6

Table 33 Intra-Assay Precision of cell stimulation and ELISA

Sample #	Mean	SD	% CV	
7	Background	61	10	16
	Stimulation Control	1768	182	10
	BAG2-I1	582	31	5
8	Background	95	10	11
	Stimulation Control	873	81	9
	BAG2-I1	347	79	17
Mean			11.3	

Table 34 Inter-Assay Precision ELISA

Sample #	Mean	SD	% CV	
10	Background 1	90	16	18
11	Stimulation Control 2 (diluted)	494	61	12
10	BAG2-I1 1	1574	205	13
11	Stimulation Control 2	1604	332	21
10	Stimulation Control 1 (diluted)	2189	295	13
Mean			15.4	

Table 35 Dilution Linearity

Sample #	Dil. Factor	Obs. [pg/ml]	Exp. [pg/ml]	Rec. O/E [%]
12	1:1	1337	--	--
	1:2	749	669	112.0
	1:4	380	334	113.7
	1:8	205	167	122.7
	1:16	91	84	108.9
13	1:1	1558	--	--
	1:2	874	779	112.2
	1:4	476	390	122.2
	1:8	252	195	129.4
	1:16	112	97	115.0
14	1:1	1421	--	--
	1:2	769	711	108.2
	1:4	408	355	114.8
	1:8	203	178	114.3
	1:16	90	89	101.3
Mean				114.6

Table 36 Spiking Recovery

Sample #	Spiked with [pg/ml]	Obs. [pg/ml]	Exp. [pg/ml]	Rec. O/E [%]
15 Non-spiked: 17 pg/ml	50	75	67	111.9
	100	109	117	93.2
	200	204	217	94.0
	400	444	417	106.5
	800	801	817	98.0
	1600	1488	1617	92.0
	3200	2728	3217	84.8
16 non-spiked: 61 pg/ml	50	108	111	97.3
	100	182	161	113.0
	200	269	261	103.1
	400	442	461	95.9
	800	820	861	95.2
	1600	1588	1661	95.6
17 non-spiked: 40 pg/ml	50	102	90	113.3
	100	116	140	82.9
	200	257	240	107.1
	400	476	440	108.2
	800	862	840	102.6
	1600	1786	1640	108.9
3200	2941	3240	90.8	
Mean				99.5

Table 37 Specificity

Leukotriene D ₄	100.0%
Leukotriene B ₄	1.1%
Leukotriene C ₄	143.6%
Leukotriene E ₄	63.6%
N-Acetyl-Leukotriene E ₄	84.9%
5-Hydroperoxyeicosatetraenoic acid (HETE)	0.02%
Prostaglandine D ₂	<0.01%
Prostaglandine E ₂	<0.01%
Prostaglandine F _{2α}	<0.01%
Thromboxane B ₂	<0.01%

Table description: cf. "Results" (page 5) and "Performance Characteristics" (page 6)

Tabellenbeschreibung: siehe "Resultate" (Seite 10) und "Leistungs-merkmale" (Seite 11)

Explications relatives aux tableaux: voir "Résultats" (page 15) et "Caractéristiques de Performance" (page 15)

Descrizione tavola: cf. "Resultati" (pagina 15) e "Caratteristiche di Prestazione" (pagina 15).

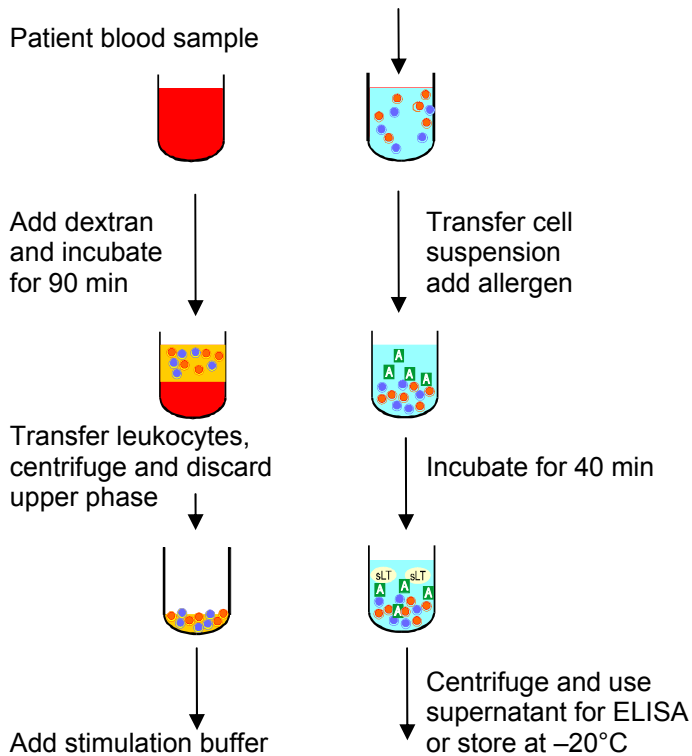
Explicaciones relativas a las Tablas: ver "Resultados" (página 15) y "Características de Eficiencia" (página 15)

Table 38

Expected Values

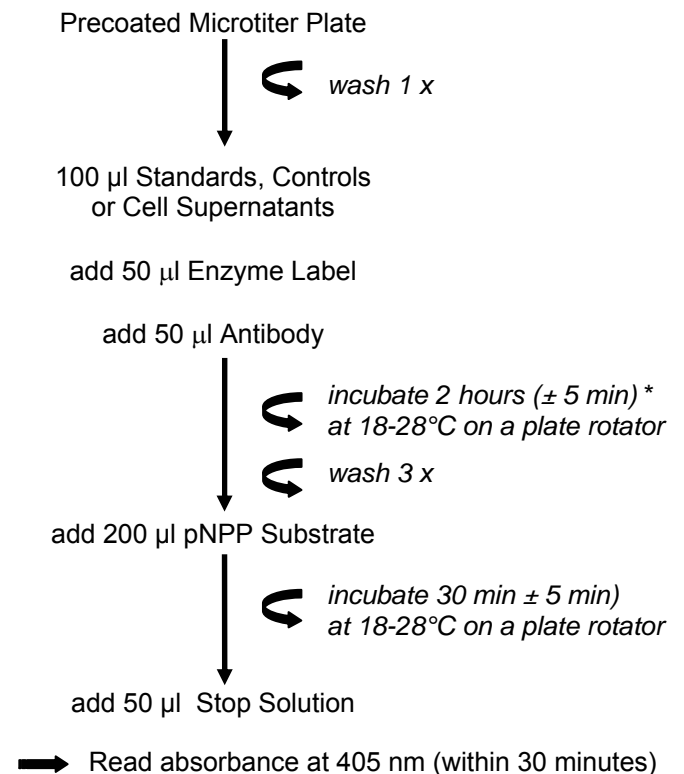
50 normal blood donors + 50 allergic individuals	n	mean [pg/ml]	median [pg/ml]	2.5% Percentile [pg/ml]	97.5% Percentile [pg/ml]	5% Percentile [pg/ml]	95% Percentile [pg/ml]	lowest [pg/ml]	highest [pg/ml]
Background	100	75	66	32	171	38	147	0	255
Stimulation Control	100	2928	2530	396	8064	451	6449	181	9560

CAST®-2000 Cell Stimulation



TOTAL INCUBATION TIME FOR CELL STIMULATION: 130 MIN

CAST®-2000 ELISA








TIME TO RESULT: 2.5 HOURS (FOR ELISA)

*alternative procedure: 16-20 hours at 2-8°C

APPENDIX III
REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ RÉFÉRENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS

1. Furukawa, K. *et al.*: *Simplified sulfidoleukotriene ELISA using LTD4- conjugated phosphatase for the study of allergen-induced leukotriene generation by isolated mononuclear cells and diluted whole blood.* J Invest Allergol Clin Immunol **4**, 110-115 (1994)
2. Kurimoto, Y. *et al.*: *The effect of Interleukin 3 upon IgE-dependent and IgE-independent basophil degranulation and leukotriene generation.* Eur J Immunol **21**, 361-368 (1991).
3. De Weck, A.L. *et al.*: *Cellular allergen stimulation test (CAST) - A new dimension in allergy diagnostics.* Allergy Clin Immunol News **5**, 9-14 (1993).
4. Scherer, K *et al.*: *Cellular in vitro assays in the diagnosis of Hymenoptera venom allergy.* Int Arch Allergy Immunol **146** (2):122-32 (2008)

APPENDIX IV
SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation	Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad	MP	Microtiter Plate Mikrotiter-Platte Microplaque Micropiastra Microplaca
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo	BUF WASH 20X	Wash Buffer Concentrate (20x) Waschpuffer-Konzentrat (20x) Tampon de lavage concentré (20x) Tampone di lavaggio concentrato (20x) Tampón de lavado concentrado (20x)
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote	BUF ELISA	ELISA Buffer ELISA-Puffer Tampon ELISA Tampone ELISA Tampón ELISA
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>	CAL	Calibrator Kalibrator Calibreur Calibratore Calibrador
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos	CONTROL L	Low Control Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso	CONTROL H	High Control Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura	REAG BLANK	Blanking Reagent Nullwert-Reagenz Réactif blanc Reagente bianco Reactivo blanco
	Upper limit of temperature Temperaturobergrenze Limite supérieure de température Limite superiore di temperatura Límite superior de temperatura	EL	Enzyme Label Enzym-Marker Marquer enzymatique Marcato enzimatico Marcador enzimático
SOLN DEX	Dextran Solution Dextran-Lösung Solution dextrans Soluzione destrano Solución de dextrano	Ab	Antibody Antikörper Anticorps Anticorpo Anticuerpo
BUF STIM	Stimulation Buffer Stimulations-Puffer Tampon de stimulation Tampone di stimolazione Tampón de estimulación	SUBS PNPP	pNPP Substrate pNPP Substrat Substrat pNPP Substrato di pNPP Substrato de pNPP
CONTROL STIM	Stimulation Control Stimulations-Kontrolle Contrôle de stimulation Controllo di stimolazione Control de estimulación	SOLN STOP	Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione stoppante Solución de parada

