

---

CE

IVD

РУССКИЙ

**Реагенты для изучения активации  
базофилов "Allergenicity Kit"**

REF

A17116



100 тестов

## Реагенты для изучения активации базофилов "Allergenicity Kit"



A17116



100 тестов

	СОДЕРЖАНИЕ	СТРАНИЦЫ
<b>1. НАЗНАЧЕНИЕ</b>		3
<b>2. ОПИСАНИЕ</b>		3
<b>3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА</b>		4
<b>4. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ</b>		5
<b>5. РЕАГЕНТЫ И СОДЕРЖИМОЕ</b>		5
5.1 СОСТАВ НАБОРА ALLERGENICITY KIT		5
5.2 РЕАГЕНТ ALLERGENICITY CRTN2-FITC/CD203c-PE/CD3-PC7		5
<b>6. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ</b>		6
<b>7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ</b>		6
7.1 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ		6
7.2 СТАБИЛЬНОСТЬ		6
7.3 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА		6
<b>8. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ</b>		7
<b>9. СБОР ОБРАЗЦОВ ДЛЯ АНАЛИЗА И ПРОБОПОДГОТОВКА</b>		8
9.1 ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЗЦАМ		8
9.2 НАСТРОЙКА ПРИБОРА		8
9.3 ПРОЦЕДУРА ПРОБОПОДГОТОВКИ		8
<b>10. ПРОЦЕДУРА ПРОБОПОДГОТОВКИ</b>		9
<b>11. EXAMPLE OF MANUAL ANALYSIS METHOD</b>		10
11.1 НАСТРОЙКА ПРОТОКОЛА		10
11.2 ПОСТРОЕНИЕ ГИСТОГРАММ		10
11.3 СОЗДАНИЕ РЕГИОНОВ		10
11.4 СОЗДАНИЕ ГЕЙТОВ		10
11.5 ПРИМЕР АНАЛИЗА		10
11.6 ПОДСЧЕТ КОЛИЧЕСТВА ИССЛЕДОВАННЫХ БАЗОФИЛОВ		10
<b>12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА</b>		10
<b>13. СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ</b>		11
13.1 ДИАПАЗОН ЛИНЕЙНОСТИ		11
13.2 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ		11
13.3 ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ		11
<b>14. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>		11
<b>APPENDIX (IN ENGLISH ONLY)</b>		12
ANALYSIS EXAMPLE		
REFERENCES		

## Реагенты для изучения активации базофилов "Allergenicity Kit"



A17116



100 тестов

### 1. Назначение

Набор реагентов для изучения активации базофилов "Allergenicity Kit" состоит из оптимизированной трехцветной комбинации конъюгированных с флуорохромами антител, раствора для активации, положительного контроля для IgE-опосредованной активации базофилов, раствора для остановки реакции, лизирующего раствора и фиксирующего раствора.

Набор предназначен «для диагностики in vitro» для обнаружения активированных базофилов. Он позволяет четко гейтировать базофилы в образцах цельной крови (CRTH2<sup>pos</sup>CD203c<sup>pos</sup>CD3<sup>neg</sup>).

### 2. Описание

Реагенты в составе данного набора позволяют обнаружить и найти отличия между покоящимися и активированными базофилами с помощью проточной цитометрии. Для этой цели используется трехцветная комбинация антител, которая представляет собой смесь двухцветных мышиных моноклональных антител (CD203c-PE и CD3-PC7) и одноцветных крысиных моноклональных антител (CRTH2-FITC).

#### Реагент CRTH2-FITC/CD203c-PE/CD3-PC7

#### CRTH2

Субпопуляции Т-хелперов 1 типа (Th1) и Т-хелперов 2 типа (Th2) различаются по профилю продуцируемых ими цитокинов. Известно, что Th1-клетки участвуют в клеточном иммунном ответе, а Th2-клетки ответственны за развитие гуморального иммунного ответа и аллергических реакций. Более того, Th1 и Th2-подобные цитокиновые профили также называют иммунный ответ 1 и 2 типа, соответственно (1–4).

CRTH2 представляет собой молекулу с семью трансмембранными доменами. Это молекула, гомологичная рецептору к хемоаттрактантам. У человека CRTH2 экспрессируется предпочтительно на Th2-клетках и цитотоксических Т-лимфоцитах (Tc2), но не обнаруживается на Th1 и Tc1-клетках (5).

CRTH2 и рецептор простагландина D (DP) сопряжены с G-белками и являются рецепторами простагландина D2 (PGD2), однако при связывании их с лигандом активируются различные внутриклеточные сигнальные пути (6, 7). PGD2 является основным метаболитом арахидоновой кислоты, который вырабатывается активированными аллергеном тучными клетками и является липидным медиатором воспаления при различных аллергических реакциях (6). CRTH2 считается также надежным поверхностным маркером, избирательным по отношению к тем циркулирующим Т-лимфоцитам (Th и Tc), которые способны к синтезу IL-4 (а также IL-5 и IL-13) и не способными к синтезу IFN $\gamma$  (5, 8).

Моноклональные антитела BM16 преципитируют белок с молекулярным весом от 55 до 70 кДа из лизата клеток линии JURKAT, трансфицированных геном CRTH2, и из определенного клона Th2-клеток (например, клона 6L21), соответствующего рецептору PGD2 (9).

Среди лейкоцитов цельной крови здоровых доноров CRTH2 сильно экспрессируется на базофилах и эозинофилах, а также на Th2 и Tc2-клетках, которые отвечают за развитие гуморального иммунитета и аллергических реакций (10, 11).

#### CD203c

Базофилы и тучные клетки являются гемопоэтическими эффекторными клетками, задействованными в процесс развития аллергических и воспалительных реакций (12–14). Оба типа клеток сильно экспрессируют высокоаффинный рецептор IgE (Fc $\epsilon$ R1). Моноклональные антитела 97A6 распознают поверхностный антиген, который экспрессируется исключительно на базофилах периферической крови человека и не экспрессируется на других клетках крови (15). Эти антитела также взаимодействуют со зрелыми тучными клетками и CD34-положительными клетками-предшественниками базофилов и тучных клеток в костном мозге. Кроме того, экспрессия антигена 97A6 увеличивается после активации базофилов антителами к IgE и различными аллергенами (16).

Маркер активации базофилов, распознаваемый моноклональными антителами 97A6, идентичен эктонуклеотид-пирофосфатазе/фосфодиэстеразе 3 (E-NPP3), которая представляет собой трансмембранный белок II типа и принадлежит к семейству эктоэнзимов, участвующих в гидролизе внеклеточных нуклеотидов (17).

На седьмой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (7<sup>th</sup> HLDA Workshop), проходившей в Харрогите, Англия, в 2000 г., было подтверждено, что моноклональные антитела 97A6 направлены против CD203c (WS Code: MC10, Section New CD antigens)(17).

### CD3

Антиген CD3 представляет собой белковый комплекс, который состоит из 5 полипептидных цепей ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  и  $\eta$ ), связанных с Т-клеточным рецептором (TCR) (18, 19). Антиген CD3 экспрессируется только на поверхности зрелых Т-лимфоцитов и субпопуляции тимоцитов (20). Около 67 - 76% лимфоцитов периферической крови являются положительными по CD3, причем у маленьких детей содержание Т-лимфоцитов ниже и их количество изменяется с возрастом (21).

Моноклональные антитела UCHT1 взаимодействуют с  $\epsilon$ -цепью комплекса CD3 (22). На первой Международной конференции по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (1<sup>st</sup> HLDA Workshop), проходившей в Париже, Франция, в 1982 г., было подтверждено, что моноклональные антитела UCHT1 направлены против CD3 (WS Code: 3, Section T) (23).

### Allergenicity Положительный контроль

Базофилы экспрессируют высокоаффинный рецептор IgE (Fc $\epsilon$ R1). Антитела к IgE распознают иммуноглобулины E, связанные с рецепторами, и, следовательно, вызывают активацию базофилов. Данный реагент является положительным контролем IgE-опосредованной активации базофилов.

### Allergenicity Раствор для активации

Данный раствор представляет собой оптимизированный буфер с высоким содержанием кальция, который позволяет активировать *in vitro* базофилы в составе цельной крови, собранной в пробирки с использованием в качестве антикоагулянта ЭДТА (этилендиаминтетраацетата).

### Allergenicity Раствор для остановки реакции

Данный раствор представляет собой оптимизированный буфер с высоким содержанием ЭДТА, который позволяет остановить процесс активации базофилов *in vitro*.

### Allergenicity Лизирующий раствор

Для анализа образца методом проточной цитометрии необходимо подготовить монодисперсную суспензию клеток и элиминировать затрудняющие анализ эритроциты. Поэтому образец для иммунофенотипирования должен быть соответствующим образом подготовлен к окрашиванию и анализу (24–26). Для пробоподготовки обычно используют один из двух методов: лизирование эритроцитов или разделение мононуклеарных клеток и эритроцитов в градиенте плотности.

Данный реагент предназначен для лизиса эритроцитов при подготовке биологических образцов к анализу методом проточной цитометрии. Его основным компонентом является циклический амин, который в присутствии карбоангидразы эритроцитов превращается в соединение, способное лизировать эритроциты.

Лизирующий раствор подходит для проточных цитофлуориметров любого типа при условии использования откалиброванных флуоресцентных антител.

### Allergenicity Фиксирующий раствор

Фиксирующий раствор из набора **Allergenicity Kit** позволяет приготовить образец цельной крови путем фиксации суспензии клеток во процессе лизиса эритроцитов. Этот раствор также используется для фиксирования готовой пробы до анализа на проточном цитофлуориметре.

## **3. Принцип анализа**

Исследуемая популяция клеток окрашивается моноклональными антителами в присутствии аллергена или контролей. Затем проводится лизис эритроцитов и анализ полученных образцов на проточном цитофлуориметре.

После исключения из области анализа Т-лимфоцитов (как CD3-положительных клеток), выполняется анализ базофилов по экспрессии CRTH2 и CD203c.

Неактивированные и покоящиеся базофилы обнаруживают по фенотипу CRTH2<sup>pos</sup>CD203c<sup>dim</sup>CD3<sup>neg</sup>, в то время как активированные *in vitro* базофилы имеют фенотип CRTH2<sup>pos</sup>CD203c<sup>bright</sup>CD3<sup>neg</sup>.

Для каждого образца крови выполняют как минимум три анализа:

- ◆ Пробирка # “Neg” = Пробирка с негативным контролем
- ◆ Пробирка # “Pos” = Пробирка с положительным контролем
- ◆ Пробирки “Test” (рекомендуется использовать аллерген в разных разведениях)

Эритроциты в каждом из образцов лизируются смесью “Fix-and-Lyse”, а интактные клетки анализируются с помощью проточной цитометрии.

Проточный цитометр измеряет светорассеяние и флуоресценцию клеток. Он позволяет выделить (гейтировать) интересующую популяцию на гистограмме, отображающей светорассеяние клеток в боковом направлении (Side Scatter или SS) и малоугловое светорассеяние (Forward Scatter или FS). Для гейтирования популяций также можно использовать другие двухпараметрические гистограммы.

Затем проводится анализ флуоресценции гейтированных клеток. При этом положительно-окрашенные клетки отличаются от отрицательных неокрашенных.

#### 4. Клиническая значимость

Базофилы как первичные эффекторные клетки играют ключевую роль в развитии реакции гиперчувствительности немедленного типа. Эти клетки экспрессируют высокоаффинный рецептор IgE (FcεR1). Аллергены вызывают активацию базофилов путем перекрестного связывания поверхностных IgE, что приводит к высвобождению медиаторов и экспрессии активационных маркеров на поверхности базофилов. В ответ на экспозицию аллергена на поверхности сенсibilизированных базофилов пациента происходит увеличение экспрессии CD203c.

Анализ антигена CD203c позволяет у сенсibilизированных пациентов обнаружить покоящиеся и активированные базофилы при моделировании IgE-зависимого ответа на аллергены (16, 27 – 30).

Данный набор реагентов предназначен для измерения *in vitro* уровня IgE-зависимого ответа на аллергены у сенсibilизированных пациентов путем анализа базофилов с помощью проточной цитометрии.

#### 5. Реагенты и содержимое

##### 5.1 Набор реагентов рассчитан на 100 тестов и имеет следующий состав:

- **Allergenicity** CRTH2-FITC / CD203c-PE / CD3-PC7 – 1 флакон (2 мл, жидкий) – 20 мкл/тест.
- **Allergenicity** Положительный контроль – 1 флакон [0.2 мг, лиофильно высушенный в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем бычий сывороточный альбумин в концентрации 2 мг/мл – 20 мкл/тест.
- **Allergenicity** Раствор для активации – 2 флакона. (2x5 мл, жидкий, содержит кальций в буферном растворе) – 100 мкл/тест.
- **Allergenicity** Раствор для остановки реакции – 1 флакон (10 мл, жидкий, содержит ЭДТА и 0.1% азида натрия) – 100 мкл/тест.
- **Allergenicity** Лизирующий раствор – 3 флакона (3x100 мл, жидкий, содержит в качестве основного активного вещества циклический амин) – 2 мл/тест.
- **Allergenicity** Фиксирующий раствор – 1 флакон (10 мл, жидкий, содержит 8% муравьиной кислоты).

Не допускается использование реагентов из набора по отдельности. При выполнении анализа убедитесь в том, что номер лота на этикетках флаконов один и тот же.

##### 5.2 Реагент Allergenicity CRTH2-FITC/CD203c-PE/CD3-PC7

###### Краткая характеристика антител

	КЛОН 1	КЛОН 2	КЛОН 3
Специфичность	CRTH2	CD203c	CD3
Клон	BM16	97A6	UCHT1
Гибридома	SP2/O-Ag8 × крысы линии Wistar	SP2/0 × Balb/c	NS1 × Balb/c
Иммуноген	Линия клеток, трансфицированных геном CRTH2 (TART/B19-12.10)	Мегакариобластная клеточная линия UT-7	T-клетки линии + IL2
Иммуноглобулин	IgG2a	IgG1	IgG1
Вид животных	Крыса	Мышь	Мышь
Флуорохром	Флуоресцеин изотиоцианат (FITC)	R Фикоэритрин (PE)	R Фикоэритрин, ковалентно связанный с Цианином 7 (PC7)
Молярное соотношение	5–7 молей FITC на 1 моль Ig	0,5–1,5 моля PE на 1 моль Ig	0,5–1,5 моля PC7 на 1 моль Ig
λ возбуждения	488 нм	488 нм	488 нм
Пик эмиссии	525 нм	575 нм	750–810 нм
Источник	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, льтивированных <i>in vitro</i>	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, льтивированных <i>in vitro</i>	Асцитическая жидкость или супернатант гибридомных клеток, льтивированных <i>in vitro</i>
Способ очистки	Ионообменная хроматография или аффинная хроматография	Аффинная хроматография	Аффинная хроматография
Основной цвет в эмиссионном спектре	Зеленый	Оранжево-красный	Дальний красный
Буфер	Фосфатно-солевой буфер (PBS), содержащий бычий сывороточный альбумин в концентрации 2 мг/мл и 0,1% NaN <sub>3</sub>		

## 6. Предупреждения

- 6.1 Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные. При работе с ними необходимо соблюдать все меры предосторожности (в частности, использовать защитные перчатки, халат и очки).
- 6.2 Некоторые реагенты в составе данного набора содержат 0,1% азид натрия. В кислой среде азид натрия образует азотисто-водородную кислоту, являющуюся потенциально опасным соединением. Азидные соединения рекомендуется утилизировать путем слива в водопроводно-канализационную систему под проточной водой. Это позволит избежать накопления азидов натрия в металлических трубах и предотвратить образование взрывчатых веществ. При попадании реагента на кожу или в глаза промойте их большим количеством воды.
- 6.3 Фиксирующий раствор Allergenicity Fixative Solution содержит формальдегид в качестве фиксатора. Формальдегид опасен для человека как в концентрации 8%, так и в концентрации 0,8%. Не вдыхайте пары формальдегида, избегайте попадания в глаза, на кожу или одежду. Формальдегид токсичен и может вызывать аллергические реакции. Формальдегид также считается канцерогеном.
- 6.4 Никогда не отбирайте образец через пипетку ртом. Избегайте контакта образца и реагентов с кожей и слизистыми оболочками.
- 6.5 Не используйте реагенты с истекшим сроком годности (срок годности указан на этикетке флакона).
- 6.6 Не замораживайте реагенты (за исключением аликвот положительного контроля).
- 6.7 Не нагревайте реагенты во время использования и хранения.
- 6.8 При нарушении времени инкубации и перемешивания или температурного режима возможно получение недостоверных результатов.
- 6.9 Плотно закрывайте флаконы с реагентами после использования во избежание испарения или утечки содержимого, в противном случае возможно получение недостоверных результатов.
- 6.10 При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
- 6.11 Не подвергайте реагенты воздействию яркого света во время хранения и инкубации.
- 6.12 Избегайте контаминации реагента микроорганизмами, в противном случае возможно получение недостоверных результатов.
- 6.13 Рекомендуется использовать те же лизирующие растворы, антитела и проточные цитофлуориметры, что использовались для вычисления ожидаемых результатов, в противном случае полученные результаты могут отличаться от ожидаемых.
- 6.14 После завершения работы пробирки с кровью и все одноразовые материалы необходимо поместить в специальные контейнеры для утилизации.
- 6.15 При работе с реагентами необходимо следовать нормативам надлежащей лабораторной практики (GLP).
- 6.16 Храните лизирующий раствор Allergenicity Lysing Solution при комнатной температуре. Если раствор хранился при температуре 4°C, перед использованием раствора необходимо дождаться, пока его температура достигнет комнатной, в противном случае возможно получение недостоверных результатов.
- 6.17 Если упаковка реагентов нарушена или были получены недостоверные результаты, свяжитесь с вашим представителем компании Beckman Coulter.

## 7. Условия хранения и стабильность

### 7.1. Условия хранения

Все реагенты должны храниться при температуре 2–8°C за исключением следующих случаев:

- Раствор для лизиса эритроцитов **Allergenicity Lysing Solution**: **хранить при температуре 18–25°C**. Лизирующий раствор из набора Allergenicity Kit следует хранить и использовать при комнатной температуре. Если лизирующий раствор хранился при температуре 4°C, перед использованием раствора необходимо дождаться, пока его температура достигнет комнатной.
- Положительный контроль для набора **Allergenicity Kit**: после ресуспендирования храните аликвоты при температуре –20°C (см. раздел 7.3.2).

### 7.2 Стабильность

При хранении при температуре 2–8°C реагенты набора **Allergenicity Kit** стабильны до окончания срока годности, указанного на этикетке. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности. После вскрытия упаковки реагенты стабильны в течение 90 дней.

### 7.3 Подготовка реагентов для анализа

*Перед использованием реагентов необходимо дождаться, пока температура всех реагентов достигнет комнатной (18–25°C).*

#### 7.3.1 Реагенты, готовые к использованию

- CRTH2-FITC/CD203c-PE/CD3-PC7;
- **Allergenicity** раствор для активации
- **Allergenicity** раствор для остановки реакции

Эти реагенты готовы к использованию прямо из флакона.

### 7.3.2 Приготовление других реагентов

#### 7.3.2.1 Allergenicity Положительный контроль

Ресуспендируйте лиофилизированный положительный контроль в 1 мл профильтрованной через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм деионизированной воды для получения концентрации вещества 0,2 мг/мл.

Мы рекомендуем аликвотировать полученный раствор и хранить при температуре -20°C. Для получения рабочего раствора разморозьте одну аликвоту и разведите ее в соотношении 1:20.

Приготовьте достаточное количество положительного контроля, чтобы хватило на все приготовленные пробы. В качестве примера расчетов используйте следующую таблицу:

	Allergenicity Положительный контроль	Фосфатно-солевой буфер (PBS)
На 10 пробирок с положительным контролем	10 мкл	190 мкл
На 20 пробирок с положительным контролем	20 мкл	380 мкл
На 50 пробирок с положительным контролем	50 мкл	950 мкл

#### 7.3.2.2 Приготовление раствора для лизиса с одновременной фиксацией.

**Allergenicity** лизирующий раствор (3×100 мл): используйте реагент непосредственно из флакона.

**Allergenicity** Фиксирующий раствор (1×10 мл): используйте реагент непосредственно из флакона.

Раствор для готовится на основе растворов **Allergenicity** Lysing Solution и **Allergenicity** Fixative Solution) в день проведения анализа на все количество проб. Не замораживайте рабочий раствор для лизиса с одновременной фиксацией. Не храните остатки готового раствора для лизиса с одновременной фиксацией.

Приготовьте необходимое количество раствора для фиксации и лизиса в зависимости от количества проб. В качестве примера расчетов используйте следующую таблицу:

	Раствор для лизиса эритроцитов для набора <b>Allergenicity Kit</b>	Фиксирующий раствор для набора <b>Allergenicity Kit</b>
На 10 пробирок	20 мл	0,5 мл
На 20 пробирок	40 мл	1 мл
На 50 пробирок	100 мл	2,5 мл

#### 7.3.2.3 Приготовление 0,1% раствора формальдегида

Приготовьте 0,1% раствор формальдегида в PBS. Для этого разведите 12,5 мкл **Allergenicity** фиксирующего раствора в 1 мл PBS (пример расчета на 2 пробирки). Приготовьте необходимое количество 0,1% раствора формальдегида в PBS в зависимости от количества проб.

Приготовьте необходимое количество буферного раствора в зависимости от количества проб. В качестве примера расчетов используйте следующую таблицу:

	Фосфатно-солевой буфер (PBS)	Фиксирующий раствор для набора <b>Allergenicity Kit</b>
На 10 пробирок	5 мл	62,5 мкл
На 20 пробирок	10 мкл	125 мкл
На 50 пробирок	25 мл	312 мкл

## 8. Необходимые, но не поставляемые материалы

8.1 Деионизированная вода.

8.2 Фосфатно-солевой буфер (PBS) (каталожный номер 6602489).

8.3 Пробирки для сбора крови с ЭДТА в качестве антикоагулянта (если в качестве антикоагулянта используется гепарин, см. раздел «Порядок анализа образцов»).

8.4 Флуоросферы Flow-Set (каталожный номер 6607007).

8.5 PC7 Set-up Kit (каталожный номер 6607121).

8.6 Реагенты для настройки компенсации флуоресценции FITC, PE, PC7.

8.7 Соответствующие изотипические контроли:

a. Иммуноглобулин крысы IgG2a-FITC (каталожный номер IM1271).

b. Иммуноглобулин мыши IgG1-PE (каталожный номер A07796).

c. Иммуноглобулин мыши IgG1-PC7 (каталожный номер 6607099).

- 8.8 Пластиковые пробирки (12 × 75 мм).
- 8.9 Водяная баня (37°C).
- 8.10 Перемешивающее устройство (вортекс).
- 8.11 Таймер.
- 8.12 Откалиброванные пипетки для многократного дозирования (20 мкл, 100 мкл и 2 мл) и наконечники.
- 8.13 Пробирки для замораживания.
- 8.14 Проточный цитофлуориметр.
- 8.15 Аллергены.

## 9. Сбор образцов для анализа и пробоподготовка

### 9.1 Требования к образцам

- 9.1.1 Забор периферической крови нужно выполнять асептическим способом в стерильную пробирку, содержащую ЭДТА в качестве антикоагулянта. До начала подготовки проб образцы крови с ЭДТА следует хранить при комнатной температуре (18–25°C).
- 9.1.2 Образцы крови с ЭДТА в качестве антикоагулянта следует проанализировать в течение 24 часов с момента забора.
- 9.1.3 Объем отбираемых образцов периферической крови должен быть оптимальным (т.е. более половины общего объема пробирки).
- 9.1.4 Можно использовать гепаринизированную цельную кровь, однако следует придерживаться модифицированной процедуры (см. раздел 9.3). Следует использовать свежие образцы.
- 9.1.5 Для анализа образцов следует использовать реагенты из одного набора.
- 9.1.6 Образцы должны храниться при комнатной температуре (18–25°C). Встряхивание образцов не допускается. Перед отбором аликвоты образец следует гомогенизировать, аккуратно перемешав. Анализ образцов необходимо выполнить в течение 24 часов после забора крови.

### 9.2 Настройка прибора

- 9.2.1 Проточный цитофлуориметр должен быть оснащен детекторами прямого и бокового светорассеивания (FS и SS), а также тремя каналами регистрации флуоресценции антител, конъюгированных с FITC, PE и PC7 (максимумы пиков эмиссии, соответственно, 504-541 / 568-590 / 750-810 нм).
- 9.2.2 Убедитесь в корректности настроек лазера и настроек напряжения на фотоумножителях (в соответствии с рекомендациями изготовителя).
- 9.2.3 Убедитесь в корректности настроек компенсации флуоресценции.  
Примерные настройки для фотоумножителей на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter (проточный цитофлуориметр EPICS XL/XL-MCL с программным обеспечением EXPO32)  
С помощью калибровочных частиц Flow-Set отрегулируйте настройки фотоэлектронных умножителей таким образом, чтобы поместить пики распределения частиц Flow-Set по светорассеиванию и интенсивности флуоресценции в указанные целевые диапазоны:

Целевые значения	
Параметр	Диапазон значений
Светорассеивание в прямом направлении (FS)	116–132
Светорассеивание в боковом направлении (SS)	370–432
LOG FL1 (FITC)	22,5–24,2
LOG FL2 (PE)	37,5–50,5
LOG FL4 (PC7)	235–270

Для оптимальной настройки проточного цитометра следуйте указаниям инструкции к флуоросферам Flow-Set и набору PC7 Set-up Kit (см. раздел 8).

### 9.3 Процедура пробоподготовки

#### ЗАМЕЧАНИЕ:

- *Приведенная процедура оптимизирована для анализа образцов цельной крови, собранных в пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта.*
  - *При пробоподготовке свежих гепаринизированных образцов цельной крови следует пропустить шаг 3 (т.е. этап добавления 100 мкл активирующего раствора).*
  - *Перед использованием реагентов необходимо дождаться, пока температура всех реагентов достигнет комнатной (18–25°C).*
    - *Каждая лаборатория должна определить собственные диапазоны разведения аллергенов.*
- Каждый раз перед проведением анализа промаркируйте необходимое количество пробирок:
- пробирка «Neg» — отрицательный контроль;
  - пробирка «Pos» — положительный контроль;
  - пробирка «Test» — аллерген (различные разведения аллергена).



1. Добавьте:
  - 20 мкл PBS в пробирку «Neg» (отрицательный контроль);
  - 20 мкл раствора **Allergenicity** Положительный контроль в пробирку «Pos» (положительный контроль);
  - 20 мкл анализируемого аллергена в пробирку «Test».
2. Добавьте в каждую пробирку по 20 мкл реагента CRTH2-FITC/CD203c-PE/CD3-PC7.
3. Добавьте в каждую пробирку по 100 мкл Раствора для активации.
4. Добавьте в каждую пробирку по 100 мкл цельной крови.
5. Аккуратно перемешайте содержимое каждой пробирки на вортексе и инкубируйте на водяной бане в течение **15 минут при температуре 37°C** в защищенном от света месте.
6. Добавьте в каждую пробирку по 100 мкл Раствора для остановки реакции и аккуратно перемешайте на вортексе в течение 5 секунд.

**Предупреждение: Allergenicity Лизирующий раствор следует хранить и использовать при комнатной температуре, в противном случае качество лизиса может ухудшиться. Если лизирующий раствор хранился при температуре 4°C, перед использованием раствора необходимо дождаться, пока его температура достигнет комнатной.**

7. Добавьте в каждую пробирку по 2 мл раствора для лизирования с одновременной фиксацией и перемешайте на вортексе.
8. Инкубируйте в течение 10 минут при комнатной температуре (18–25°C) в защищенном от света месте.
9. Отцентрифугируйте пробирки в течение 5 минут при 200 × g и удалите супернатант аспирацией.
10. Добавьте в каждую пробирку по 3 мл PBS.
11. Отцентрифугируйте пробирки в течение 5 минут при 200 × g и удалите супернатант аспирацией.
12. Ресуспандируйте осадок клеток в 0,5 мл 0,1% раствора формальдегида в PBS.
13. Проанализируйте пробы на проточном цитофлуориметре.

Если готовые пробы не удастся проанализировать на цитометре в течение 1 часа, их следует хранить при температуре 2-8°C в защищенном от света месте. Рекомендуется выполнить анализ готовых проб в течение 4 часов.

## 10. Процедура пробоподготовки

	Пробирка «Neg» (отрицательный контроль)	Пробирка «Pos» (положительный контроль)	Пробирка «Test»
Фосфатно-солевой буфер (PBS)	20 мкл		
Положительный контроль		20 мкл	
Аллергены			20 мкл
Реагент CRTH2-FITC/CD203c-PE/ CD3-PC7	20 мкл	20 мкл	20 мкл
Раствор для активации	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Цельная кровь с ЭДТА	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Аккуратно перемешайте на вортексе			
Инкубируйте в течение 15 минут при температуре 37°C в защищенном от света месте (РЕКОМЕНДУЕТСЯ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ВОДЯНУЮ БАНЮ)			
Раствор для остановки реакции	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Аккуратно перемешайте на вортексе			
Раствор для лизирования с одновременной фиксацией	<b>Предупреждение: Allergenicity Лизирующий раствор следует хранить и использовать при комнатной температуре, в противном случае качество лизиса может ухудшиться. Если лизирующий раствор хранился при температуре 4°C, перед использованием раствора необходимо дождаться, пока его температура достигнет комнатной.</b>		
	2 мл	2 мл	2 мл
Аккуратно перемешайте на вортексе			
Инкубируйте в течение 10 минут при температуре 18–25°C в защищенном от света месте			
Отцентрифугируйте в течение 5 минут при 200 × g Удалите супернатант аспирацией			
Фосфатно-солевой буфер (PBS)	3 мл	3 мл	3 мл
<b>Отмывка:</b> Отцентрифугируйте в течение 5 минут при 200 × g Удалите супернатант аспирацией Ресуспандируйте в 0,5 мл 0,1% раствора формальдегида в PBS			
Выполните анализ на проточном цитофлуориметре <b>Закончите сбор данных, когда будет накоплено 500 базофилов (регион C)</b>			

## 11. Пример анализа образцов

### 11.1 Настройка протокола

Проточный цитофлуориметр должен быть оснащен детекторами прямого и бокового светорассеивания (FS и SS), а также детекторами регистрации флуоресценции антител, конъюгированных с FITC, PE и PC7.

### 11.2 Построение гистограмм

Для обнаружения покоящихся и активированных базофилов постройте следующие гистограммы:

1. Гистограмма 1: Прямое светорассеивание FS — Боковое светорассеивание SS.
2. Гистограмма 2: CD3-PC7 — Боковое светорассеивание SS.
3. Гистограмма 3: CRTH2-FITC — CD203c-PE.
4. Гистограмма 4: CRTH2-FITC — CD203c-PE.

### 11.3 Создание регионов

Создайте следующие регионы:

1. На гистограмме 1 создайте аморфный/полигональный регион A, включив в него все лейкоциты и исключив агрегаты клеток и дебрис от лизированных эритроцитов.
2. На гистограмме 2 создайте прямоугольный регион B, включив в него все лимфоциты и моноциты и исключив клетки CD3<sup>bright</sup> (T-лимфоциты).
3. На гистограмме 3 создайте прямоугольный регион C, включив в него все клетки с фенотипом CRTH2<sup>pos</sup>CD203c<sup>pos</sup>CD3<sup>neg</sup>.
4. На гистограмме 4 создайте квадрантный регион D, включив в него все клетки с фенотипом CRTH2<sup>pos</sup>CD203c<sup>pos</sup>CD3<sup>neg</sup>.

### 11.4 Создание гейтов

1. Гистограмма 1: не гейтированная, отображает все полученные при сборе данных события.
2. Гистограмма 2: Примените гейт A к гистограмме 2, для того чтобы отобразить все лейкоциты, но исключить из зоны анализа агрегаты клеток и дебрис от лизированных эритроцитов.
3. Гистограмма 3: Примените гейты A и B (AB) к гистограмме 3, для того чтобы отобразить все базофилы с фенотипом CRTH2<sup>pos</sup>CD203c<sup>pos</sup>CD3<sup>neg</sup>.
4. Гистограмма 4: Примените гейты A, B и C (ABC) к гистограмме 4, для того чтобы отобразить все события с фенотипом CRTH2<sup>pos</sup>CD203c<sup>pos</sup>CD3<sup>neg</sup>.

### 11.5 Пример анализа

См. Приложение.

### 11.6 Подсчет количества исследованных базофилов

См. Приложение.

## 12. Ограничения метода

- 12.1 При неправильной настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и неправильном определении регионов могут быть получены недостоверные результаты.
- 12.2 Конъюгаты антител данного реагента откалиброваны для получения наилучшего соотношения специфического и неспецифического сигнала. Поэтому в каждом исследовании необходимо строго соблюдать соотношение между объемом реагента и количеством клеток в образце.
- 12.3 Для получения точных и воспроизводимых результатов необходимо соблюдать все приведенные инструкции и следовать нормативам надлежащей лабораторной практики (GLP).
- 12.4 Перед использованием реагентов необходимо дождаться, пока их температура достигнет комнатной (18–25°C).
- 12.5 Следует контролировать качество готовых проб: невооруженным взглядом следует оценивать качество лизиса. Мутность, непрозрачность проб или необычное распределение клеток по светорассеиванию могут свидетельствовать о незавершенности лизиса.
- 12.6 Эритробласты могут лизироваться не полностью и поэтому на гистограмме распределения клеток по светорассеиванию попадать в зону лейкоцитов.
- 12.7 Ацетазоламид, являющийся ингибитором карбоангидразы, способен полностью ингибировать действие лизирующего раствора.
- 12.8 Вследствие tandemной структуры данного флуорохрома, PC7 также испускает излучение при 575 нм. Данный вторичный пик эмиссии зависит от номера партии PC7. Поэтому для выполнения многоцветного анализа необходимо тщательно отрегулировать величины компенсации при смене партии конъюгатов PC7.

## 13. Специальные характеристики

### 13.1 Диапазон линейности

Для проверки линейности окрашивания данным реагентом были смешаны в различных пропорциях клетки положительной линии (KU812 или MOLT16) и клетки отрицательной линии (KG-1a). Общее количество

клеток в образце оставалось постоянным. Соотношение клеток положительной и отрицательной линий изменялось от 0 до 100%.

Аликвоты суспензий клеток окрашивали трехцветной комбинацией антител. На основании полученных и ожидаемых значений вычислялась линейная регрессия. Параметры уравнения линейной регрессии могут использоваться для определения линейности и диапазона измерения.

Специфичность	Проанализированные клеточные линии	Линейность (R <sup>2</sup> )	Диапазон значений (%)
CRTH2-FITC	MOLT16 + KG-1a	0,99	0,1–90
CD203c-PE	KU812 + KG-1a	0,99	0,1–97
CD3-PC7	MOLT16 + KG-1a	0,99	2,0–98

### 13.2 Ожидаемые значения

Каждая лаборатория должна определить собственные референсные интервалы на основании исследования образцов здоровых доноров местной популяции. При этом необходимо учитывать возраст, пол и этническую принадлежность доноров, а также другие возможные межрегиональные различия.

Общее количество базофилов	Количество образцов	Среднее (%)	SD	CV (%)
CRTH2 <sup>pos</sup> CD203c <sup>pos</sup> CD3 <sup>neg</sup>	50	0,62	0,31	51

В наших лабораториях было проведено исследование образцов цельной крови 50 здоровых людей с использованием вышеописанного реагента. В приведенной таблице представлены результаты подсчета положительных событий.

### 13.3 Внутрилабораторная воспроизводимость результатов

В один день на одном цитофлуориметре в одном образце определялось процентное содержание всех неактивированных и активированных базофилов (после стимуляции антителами к IgE *in vitro*). Измерение выполнялось 12 раз. Полученные результаты представлены в следующей таблице:

Базофилы	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
Активированные	12	94,26	1,06	1,1
Неактивированные	12	5,39	1,33	24,6
Всего	12	0,54	0,05	8,5

## 14. Список литературы

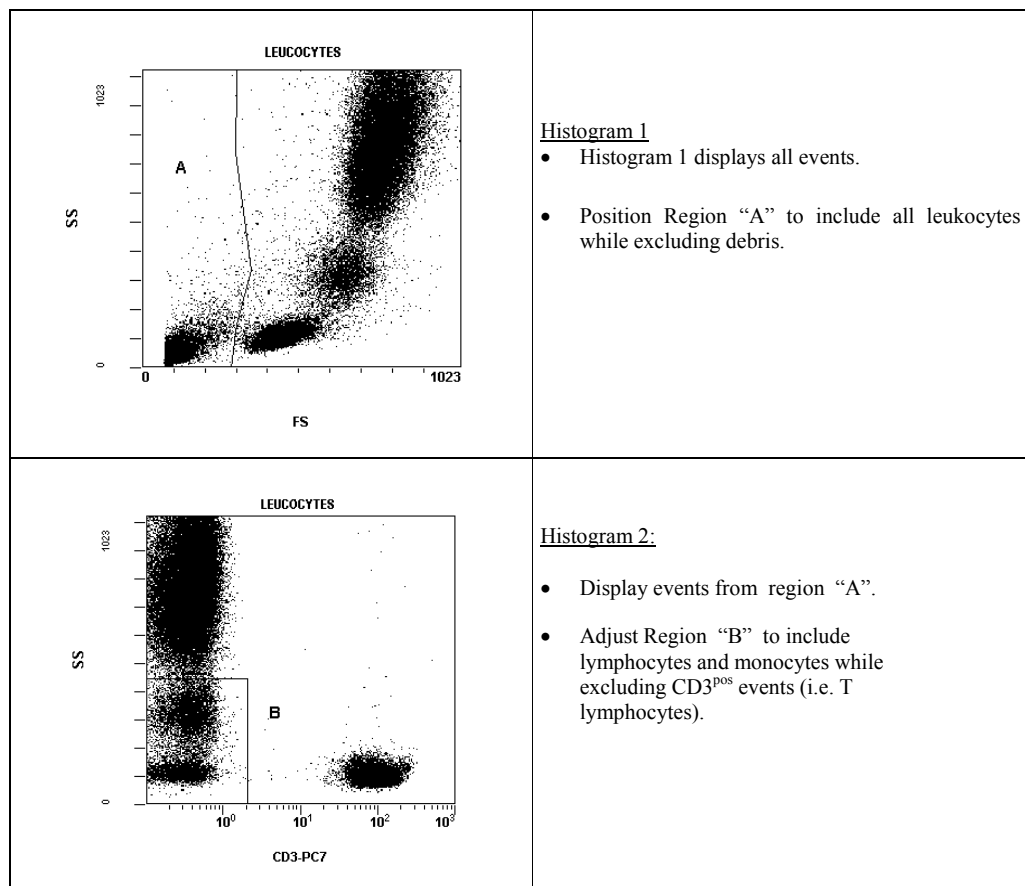
См. приложение.

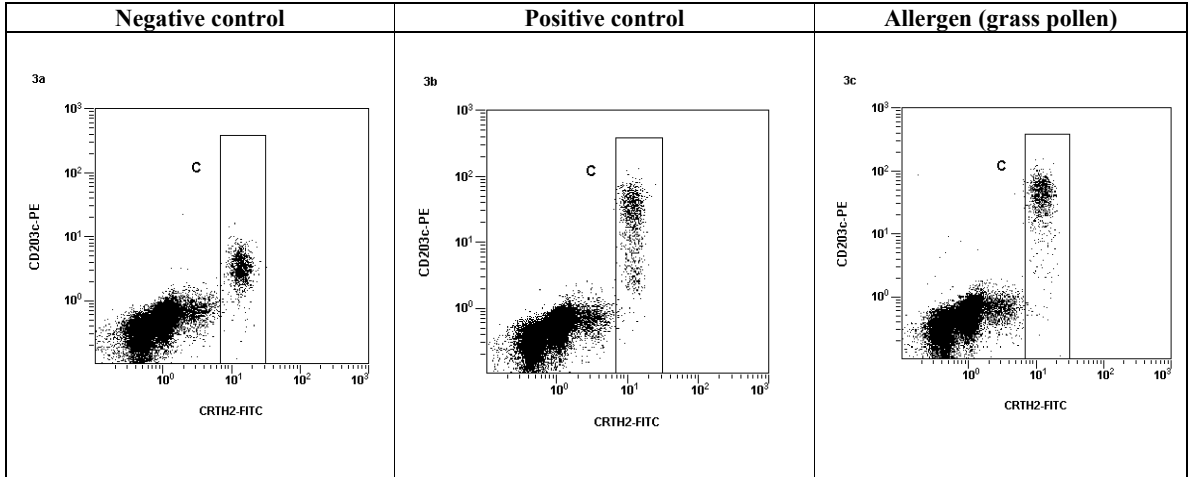
## APPENDIX TO REF A17116

### 11.5 Analysis Example

The following histograms display examples in an ascending number order as displayed on the protocol. The following histograms correspond to the analysis of the whole blood from an allergic patient stained with CRTH2-FITC / CD203c-PE / CD3-PC7 reagents.

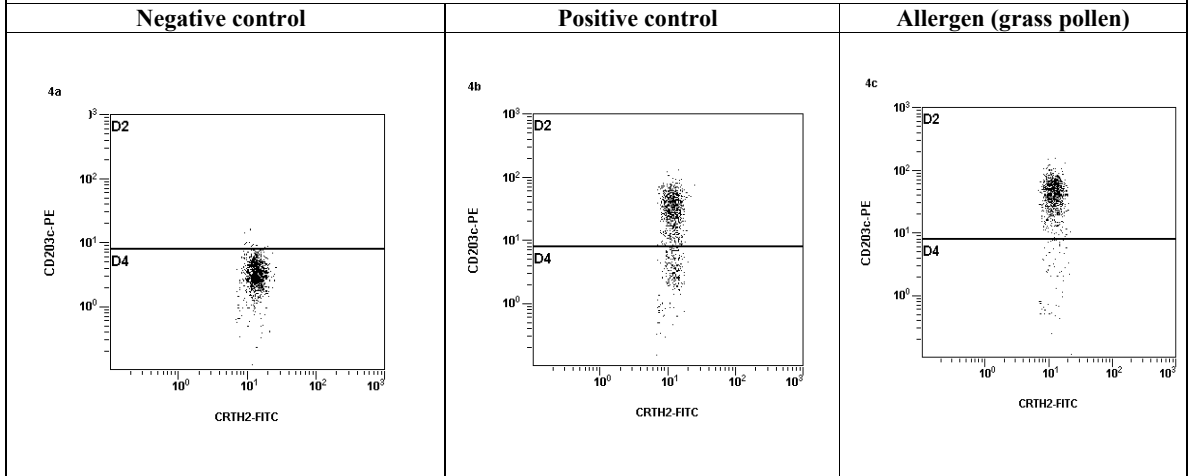
**NOTE:** Below are histograms obtained on a BECKMAN COULTER CYTOMICS FC 500 flow cytometer equipped with the CYTOMICS RXP Software .





Histograms 3a, 3b and 3c:

- Display events from gate “A” and “B” (AB).
- Adjust Region C to include all clustered CRTH2<sup>POS</sup>CD203c<sup>POS</sup>CD3<sup>NEG</sup> events.
- Region C allows the determination of the Y- Median fluorescence intensity parameter of non-activated and activated basophils.



Histograms 4a, 4b and 4c:

- Display all events from gate “A” and “B” and “C” (ABC)
- Adjust Quadstat to include CRTH2<sup>POS</sup>CD203c<sup>POS</sup>CD3<sup>NEG</sup> cluster of cells (95 – 98% of cells) on the lower quadrant D4 from the non-activated whole blood sample (**Negative Control Tube**, Histogram 4a). The x-axis of D4 region must be the same for the negative control, positive control and activated sample with allergen (Histograms 4a, 4b and 4c). Quadrants D1 and D3 are aligned on the y axis of the histogram 4.
- Lower quadstat (i.e. D4 region) defines the region of non-activated basophils. Lower quadstat gives the percentage of non activated basophils on the statistic printout.
- Upper quadstat (i.e. D2 region) defines the region of activated basophils. Upper quadstat gives the % of activated basophils on the statistic printout.

**11.6 Calculation of Analyzed Basophils**

- Histograms 3a, 3b and 3c allows the analysis of activated basophils using the Y-Median fluorescence intensity as parameter for data interpretation.
- Histograms 4a, 4b and 4c allow the analysis of activated basophils using the percentage of activated basophils as parameter for data interpretation.

## 14. REFERENCES

1. Mosmann, T.R., Sad, S., "The expanding universe of T-cell subsets : Th1, Th2 and more", 1996, *Immunol. Today*, 3, 17, 138-146.
2. Sander, B., Anderson, J., Anderson, U., "Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-sonication procedure", 1991, *Immunol. Rev.*, 119, 65-93.
3. Romagnani, S., "Biology of human TH1 and TH2 cells, 1995, *J. Clin. Immunol.*, 3, 15, 121-129.
4. Carter, L.L., Swain, S.L., "Single cell analyses of cytokine production", 1997, *Curr. Opin. Immunol.*, 9, 177-182.
5. Cosmi, L., Annunziato, F., Maggi, E., Romagnani, S., Manetti, R., "Chemoattractant Receptors expressed on Type 2 T cells and their role in disease", 2001, *Int. Arch Allergy Immunol.*, 125, 273-279.
6. Hirai, H., Tanaka, K., Takano, S., Ichimasa, M., Nakamura, M., and Nagata, K., "Cutting Edge: Agonistic Effect of Indomethacin on a Prostaglandin D2 Receptor, CRTH2", 2002, *J. Immunol.*, 168, 981-985.
7. Hirai, H., Tanaka, K., Yoshie, O., Ogawa, K., Kenmotsu, K., Takamori, Y., Ichimasa, M., Sugamura, K., Nakamura, M., Takano, S., and Nagata, K., "Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2", 2001, *J. Exp. Med.*, 2, 193, 255-261.
8. Cosmi, L., Annunziato, F., Iwasaki, M., Galli, G., Manetti, R., Maggi, E., Nagata, K., and Romagnani, S., "CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease", 2000, *Eur. J. Immunol.*, 30, 2972-2979.
9. Nagata, K., Tanaka, K., Ogawa, K., Kemmotsu, K., Imai, T., Yoshie, O., Abe, H., Tada, K., Nakamura, M., Sugamura, K., and Takano, S., "Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo", 1999, *J. Immunol.*, 162, 1278-1286.
10. Nagata, K., Hirai, H., Tanaka, K., Ogawa, K., Aso, T., Sugamura, K., Nakamura, M., Takano, S., "CRTH2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and responds to mast cell-derived factor(s)", 1999, *FEBS Letters*, 459, 195-199.
11. Cosmi, L., Annunziato, F., Galli, G., Manetti, R., Maggi, E., and Romagnani, S., "CRTH2: marker for the detection of human Th2 and Tc2 cells", 2001, *Progress in Basic and Clinical Immunology*, Edited by Mackiewicz et al. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2001, 25-29.
12. Holgate, S.T., "The role of mast cells and basophils in inflammation", 2000, *Clin. Exp. Allergy*, 30, 28-32.
13. Galli, S.J., "Mast cells and basophils", 2000, *Curr. Opin. Hematol.*, 7, 32-39.
14. Johnston, S.L., Holgate, S.T., "Cellular and chemical mediators their roles in allergic diseases", 1990, *Curr. Opin. Immunol.*, 2, 513-524.
15. Bühring, H.J., Simmons, P.J., Pudney, M., Müller, R., Jarrossay, D., van Agthoven, A., Willheim, M., Brugger, W., Valent, P., and Kanz, L., "The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors", 1999, *Blood*, 7, 94, 2343-2356.
16. Platz, J.J., Binder, M., Marxer, A., Lischka, G., Valent, P., Bühring, H.J., "Hymenoptera-venom-induced upregulation of the basophil activation marker ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 in sensitized individuals.", 2001, *Int Arch Allergy Immunol.*, 126, 4, 335-42. Erratum in: 2002, *Int Arch Allergy Immunol.*, 127, 4, 293.
17. Bühring, H.J., "E-NPP3 (CD203c)", 2002, *Leucocyte typing VII, Section New CD antigens, MC10*, Oxford University Press, 377-378.
18. Thibault, G., Bardos, P., "Compared TCR and CD3ε expression on αβ and γδ cells. Evidence for the association of two TCR heterodimers with three CD3ε chains in the TCR/CD3 complex", 1995, *J. Immunol.*, 154, 3814-3820.
19. Shores, E.W., Love, P.E., "TCR ζ-chain in T cell development and selection", 1997, *Curr. Opin. Immunol.*, 9, 380-389.
20. Van Agthoven, A., Terhorst, C., Reinherz, E.L., Schlossman, S.F., "Characterization of T cell surface glycoproteins T1 and T3 present on all human peripheral T lymphocytes and functional mature T lymphocytes", 1981, *Eur. J. Immunol.*, 11, 18-21.
21. Hannel, I., Erkeller-Yuksel, F., Lydyard, P., Deneys, V., DeBruyère, M., "Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations", 1992, *Immunol. Today*, 6, 13, 215-218.
22. Tunnacliffe, A., Olsson, C., Traunecker, A., Krissansen, G.W., Karjalainen, K., De la Hera, A., "The majority of CD3 epitopes are conferred by the ε chain", 1989, *Leucocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens*. W. Knapp, et al., Eds., Oxford University Press, 295-296.
23. Bernard, A., Brottier, P., Georget, E., Lepage, V., Boumsell, L., "Joint report of the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories", 1984, *Leucocyte Typing I*, Bernard, A. et al., Springer Verlag, 9-135.
24. Dressler, L.G., "Specimen handling, storage, and preparation", 1997, *Curr. Protocols Cytometry*, Chapter 5, 5.0.1-5.2.15.
25. Stelzer, G.T., Marti, G., Hurley, A., McCoy, P.Jr., Lovett, E.J., Schwartz, A., "U.S. Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: Standardization and validation of laboratory procedures", 1997, *Cytometry*, 30, 214-230.
26. Borowitz, M., Bauer, K.D., Duque, R.E., Horton, A.F., Marti, G., Muirhead, K.A., Peiper, S., Rickman, W., "Clinical applications of flow cytometry: Quality assurance and immunophenotyping of lymphocytes; approved guideline", 1998, *NCCLS*, 21, 18.

27. Kahlert, H., Cromwell, O., Fiebig, H., "Measurement of basophil-activating capacity of grass pollen allergens, allergoids and hypoallergenic recombinant derivatives by flow cytometry using anti-CD203c.", 2003, *Clin. Exp. Allergy*, 33, 9, 1266-1272.
28. Boumiza, R., Monneret, G., Forissier, M.F., Savoye, J., Gutowski, M.C., Powell, W.S., Bienvenu, J., "Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63.", 2003, *Clin Exp Allergy*, 33, 2, 259-265.
29. Binder, M., Fierlbeck, G., King, T., Valent, P., Buhning, H.J., "Individual hymenoptera venom compounds induce upregulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (CD203c) in sensitized patients.", 2002, *Int Arch Allergy Immunol.*, 129, 2, 160-168.
30. Hauswirth, A.W., Natter, S., Ghannadan, M., Majlesi, Y., Scherthaner, G.H., Sperr, W.R., Buhning, H.J., Valenta, R., Valent, P., "Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals.", 2002, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 110, 1, 102-109.

## **TRADEMARKS**

Beckman Coulter logo, Flow-Check, Flow-Set, IOTest, Navios and VersaLyse are trademarks of Beckman Coulter; Beckman Coulter logo, IOTest and VersaLyse are registered in the USPTO and SIPO.



Manufactured by:

Immunotech SAS, a Beckman Coulter Company

130 avenue de Lattre de Tassigny, B.P. 177

13276 Marseille Cedex 9, France

Customer Service : (33) 4 91 17 27 27

***[www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com)***

Printed in France.

Made in France.

© 2011 Beckman Coulter, Inc.

All Rights Reserved.

***For In vitro Diagnostic Use***

**Not for Sale in US**