



НАБОР ДЛЯ ОЦЕНКИ АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

Кат.№ FK-CCR
Производитель: BUHLMANN LABORATORIES AG, (Швейцария)

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

Методика от 25-05-2011

НАЗНАЧЕНИЕ

Flow2 CAST - набор для оценки активации базофилов. Этот тест может использоваться для определения аллергической реакции немедленного типа и гиперчувствительности к предполагаемому антигену в условиях *in vitro*. Набор Flow2 CAST может использоваться для диагностической оценки экспрессии CD63 на базофилах при антигенной стимуляции в цельной крови *in vitro* с последующей оценкой на проточном цитофлуориметре.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Этот тест основан на методе, впервые описанном Sainte-Laudy et al. в 1994 и 1996 (1, 2), где активацию базофилов под действием аллергенов или в контроле оценивали на проточном цитофлуориметре по увеличению экспрессии CD63 (gp63) на поверхности клетки. Также определяли IgE-опосредованные реакции (3, 5) к цельной крови, взятой с ЭДТА у пациента, предположительно страдающего аллергией/гиперчувствительностью, добавляют буфер для стимуляции (Stimulating Buffer) и аллерген. Аллерген позволяет воспроизвести реакцию *in vivo*, где специфический IgE связывается с аллергеном на поверхности клетки и активирует внутриклеточный сигнальный каскад, ведущий к активации базофила. Вследствие этого, внутриклеточные везикулы, несущие трансмембранный белок CD63, сливаются с клеточной мембраной и белок появляется на поверхности клетки. В качестве положительного контроля используют высокоспецифичные моноклональные антитела, которые связываются с высокоаффинным IgE-рецептором (FcεR1), или неспецифический стимулятор fMLP.

Одновременно со стимуляцией проводят окрашивание клеток с помощью реагента для окраски (Staining Reagent) - смеси моноклональных антител к CD63 человека, конъюгированных с флуоресцеин изотиоцианатом (анти-CD63-FITC), и к хемокиновому рецептору CCR, меченому фикоэритрином (анти-CCR3-PE). CCR3 конститутивно экспрессируется на эозинофилах и базофилах (6, 7). Эритроциты удаляют с помощью лизирующего агента и центрифугирования, после чего клетки ресуспендируют в отмывающем буфере (Wash Buffer) и анализируют на проточном цитофлуориметре.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ И ИХ ПОДГОТОВКА

Реагенты	Кол-во	Код	Подготовка
Стимулирующий буфер , содержит кальций, гепарин и ИЛЗ	1 флакон, лиофил.	B-CCR-STB	Растворить в 50 мл воды ¹⁾
Контрольный стимулятор , MAT анти-Fc _ε R1	1 флакон, лиофил.	B-CCR-STCON	Растворить в 1,5 мл B-CCR-STB
Контрольный стимулятор fMLP ²⁾	1 флакон, лиофил.	B-CCR-fMLP	Растворить в 1,5 мл B-CCR-STB
Реагент для окраски . Смесь MAT анти-CD63-FITC и CCR3-PE	1 флакон, 2,2 мл	B-CCR-SR	Готов для использования
Лизирующий реагент ³⁾ , 10 x концентрат	1 флакон, 25 мл	B-CCR-LYR	Добавить 225 мл деионизированной воды
Промывочный буфер	1 флакон, 100 мл	B-CCR-WB	Готов для использования

1) Более подробно о качестве требуемой воды смотрите в разделе «Рекомендации»

2) N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин

3) При хранении при 2-8 °C могут образоваться кристаллы, которые следует растворить при температуре 18-28 °C перед разведением.

УСЛОВИЯ И ДЛИТЕЛЬНОСТЬ ХРАНЕНИЯ РЕАГЕНТОВ

Невскрытые реагенты	
Хранить при 2-8 °C до даты, указанной на флаконе.	
Вскрытые/растворенные реагенты	
Стимулирующий буфер	Стабилен при -20 °C в течение 6 мес. Если планируется несколько постановок, реагенты следует аликвотировать.
Контрольный стимулятор , MAT анти-Fc _ε R1	Стабилен при -20 °C в течение 6 мес. Если планируется несколько постановок, реагенты следует аликвотировать.
Контрольный стимулятор fMLP	Стабилен при -20 °C в течение 6 мес. Если планируется несколько постановок, реагенты следует аликвотировать.
Реагент для окраски	Хранить при 2-8 °C до даты, указанной на флаконе.
Лизирующий реагент	Хранить при 2-8 °C до даты, указанной на флаконе.
Промывочный буфер	

АЛЛЕРГЕНЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ ПО ЗАКАЗУ

Номера по каталогу можно узнать на сайте www.buhmannlabs.ch.

- **Белковые аллергены:** Компания BUHLMANN гарантирует высокое качество белковых аллергенов и производит их в виде жидкого концентрата (1 мкг/мл). Белковые аллергены требуется хранить в холодильнике и разводить перед использованием.

- **Лекарства и химические аллергены:** BUHLMANN производит низкомолекулярные аллергены в лиофилизированном виде. Низкомолекулярные аллергены следует хранить в холодильнике и растворять перед использованием.

ТРЕБОВАНИЯ К АЛЛЕРГЕНАМ ИЗ ДРУГИХ ИСТОЧНИКОВ

При работе с набором Flow2 CAST® допускается использование аллергенов других производителей, однако они должны удовлетворять следующим требованиям: не должны быть конъюгированы с какими-либо носителями.

Не должны содержать цитотоксических компонентов (стабилизаторы, консерванты) такие как глицерин, фенол, азид натрия или мертиолат (тимеросал).

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Реагенты набора не содержат биоматериала человека. Ко всем образцам крови пациентов следует относиться как к потенциальному источнику инфекции и соблюдать все необходимые правила предосторожности.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

- Пробирки с раствором К-ЭДТА для забора крови.
- Центрифуга для пробирок, 500g.
- Одноразовые полипропиленовые или полистиролловые пробирки и подходящие штативы.
ЗАМЕЧАНИЕ: Полистиролловые пробирки должны подходить к проточному цитометру.
- Вортекс.
- Автоматические пипетки переменной объема: 10-100 мкл, 100-1000 мкл, 1-5 мл и 10-50 мкл.
- Мерная посуда для приготовления стимулирующего буфера.
- Стерильная, ультрачистая, апиrogenная вода для приготовления растворов клеточных стимуляторов.
- Водяная баня на 37 °C.
- Дистиллированная или деионизированная вода и мерная посуда для приготовления лизирующего реагента и отмывающего буфера.
- Проточный цитофлуориметр с синим лазером (488 нм) и соответствующим программным обеспечением.

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Пациенту следует отказаться от приема системных противоаллергических препаратов, таких как кортикостероиды и кромоглициловая кислота за 24 часа до забора крови. При сборе крови в пробирку с раствором антикоагулянта следует соблюдать соотношение кровь: К-ЭДТА. При наполнении пробирки менее чем на 50% концентрация ЭДТА может оказаться слишком высокой и исказить результат. 1 мл крови достаточно для проведения 18 тестов. Образцы крови немедленно используют для исследования или хранят при 2-8 °C в течение 48 часов. Для определения ответа

на лекарства хранение крови возможно только в течение 24 часов.

Не центрифугируйте и не замораживайте образцы.

РЕКОМЕНДАЦИИ

- **Качество используемой для Flow2CAST® воды.** Для разведения стимулирующего буфера (B-CCRSTB) рекомендуется использовать стерильную, ультрачистую, апиrogenную воду. Это обеспечит хорошую воспроизводимость результатов. Можно использовать воду предназначенную для приготовления культуральных сред, бидистиллированную воду, пропущенную через фильтр 10 кДа. Лизирующий реагент (B-CCR-LYR) можно разводить деионизированной, бидистиллированной или водой для стимулирующего буфера.

- **Меры предосторожности для предотвращения контаминации аллергенами во время стимуляции клеток.**

Следует закрывать пробирки с образцами, т.к. летучие аллергены лаборатории могут контаминировать открытые образцы крови и суспензии клеток и создавать повышенный фоновый уровень дегрануляции. Постарайтесь оградить рабочее место от доступа пыли (клещей пыли), пылевых растений, не используйте латексные перчатки и оборудование, содержащее латекс, не открывайте окон во время проведения стимуляции клеток. В связи с этим рекомендуется использовать для постановки теста ламинарный шкаф.

- Стимуляцию клеток и окрашивание можно проводить в микропланшетах для культуральных работ.

ПРОЦЕДУРА ПОСТАНОВКИ

Важно: Данная процедура оптимизирована для постановки на образцах цельной крови, взятых с ЭДТА.

1. Перемешайте образец крови несколько раз перевернув закрытую пробирку в руках.
2. Подготовьте новые полипропиленовые или полистиролловые пробирки на 3,5 мл, подходящие для работы на проточном цитофлуориметре.
3. Подпишите пробирки для каждого пациента следующим образом:
 - П1Ф – фоновая проба пациента 1
 - П1С1 – стимуляция антителами анти-FcεR1
 - П1С2 – стимуляция fMLP
 - A1-1 - стимуляция аллергеном 1 в разведении 1
 - A1-2 - стимуляция аллергеном 1 в разведении 2
 - и т.д.

Стимуляция и окрашивание

4. Добавьте по 50 мкл каждого стимулятора в соответствующую пробирку:
 - П1Ф – 50 мкл стимулирующего буфера (фон)
 - П1С1 – 50 мкл стимулирующих антител анти-FcεR1
 - П1С2 – 50 мкл fMLP
 - A1-1, A1-2 и т.д. – 50 мкл соответствующих разведений аллергенов.
5. Добавьте по 100 мкл стимулирующего буфера в каждую пробирку.
6. Добавьте по 50 мкл цельной крови в каждую пробирку. Удостоверьтесь, что на стенках пробирки нет следов крови.
7. Осторожно перемешайте.
8. Добавьте по 20 мкл реагента для окраски в каждую пробирку.
9. Осторожно перемешайте, закройте пробирку и инкубируйте 15 минут при 37 °C **на водяной бане** (если Вы используете инкубатор, то следует увеличить время инкубации на 10 минут).

Лизис

10. Добавьте 2 мл лизирующего реагента комнатной температуры в каждую пробирку. Осторожно перемешайте.
11. Инкубируйте 5 -10 минут при комнатной температуре.
12. Центрифугируйте пробирки в течение 5 минут при 500хg.
13. Удалите супернатант с помощью фильтровальной бумаги.
14. Ресуспандируйте осадок клеток в 300 мкл отмывочного буфера.

Замечание: В зависимости от марки проточного цитофлуориметра можно использовать большие количества отмывочного буфера.
15. Осторожно перемешайте.
16. Анализ образцов на проточном цитометре следует провести в тот же день. Образцы можно хранить в защищенном от света месте при 2-8 °C в течение нескольких часов.

Замечание: Допустимо исследовать образцы, которые хранили в защищенном от света месте при 2-8 °C в течение ночи, однако

может наблюдаться снижение интенсивности флуоресценции и менее четкое выделение базофилов.

СБОР ДАННЫХ НА ПРОТОЧНОМ ЦИТОФЛУОРИМЕТРЕ

Сбор данных может быть осуществлен на любом проточном цитофлуориметре, оснащенном аргонным лазером 488 нм.

Проточный цитофлуориметр также должен регистрировать прямое (FSC) и боковое светорассеяние (SSC) и флуоресценцию FITC и PE. Убедитесь, что напряжение на каналах флуоресценции и значения цветовой компенсации выставлены правильно.

Во время анализа образцов удостоверьтесь, что на графике FSC/SSC наблюдается 3 отдельные популяции. Настройте усиление на каналах FSC и SSC таким образом, чтобы получить распределение событий как на рис. 1. Обратитесь к инструкции цитофлуориметра.

В среднем сбор данных можно останавливать после набора 500-600 базофилов (при выделении региона как на рис. 2). Следует собирать не менее 200 базофилов, что соответствует 50 000 – 100 000 проанализированных лейкоцитов. Т.к. при лекарственной аллергии наблюдается низкий процент активации, то в каждой лаборатории может устанавливаться собственное минимальное количество проанализированных базофилов (при лекарственной аллергии следует собирать не менее 300 базофилов).

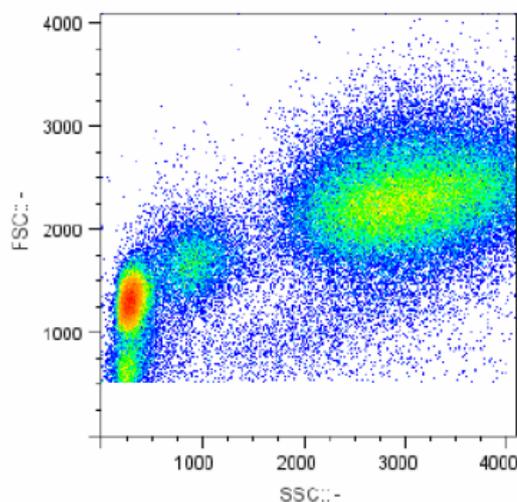


Рисунок 1. Три отдельные популяции (лимфоциты, моноциты и гранулоциты) на диаграмме FSC/SSC

АНАЛИЗ ДАННЫХ

Анализ данных может быть осуществлен в любом программном обеспечении для проточного цитофлуориметра, например FlowJo, FloMax, CellQuest и др.

Анализ выполняется в 2 этапа:

1. На диаграмме SSC/FL2(CCR3-PE) создайте регион 1 (R1) таким образом, чтобы включить все события CCR3+ с низким боковым светорассеянием (SSC_{low}) – базофилы (см. рис.2). В правом верхнем квадранте останутся эозинофилы – положительные по CCR3, но с более высоким сигналом по SSC (SSC_{high}).
2. Гейтируйте диаграмму FL2(CCR3-PE)/FL1(CD63-FITC) по региону базофилов R1. Определите процент базофилов с высокой экспрессией CD63 (рис.3 и 4, квадрант Q2).

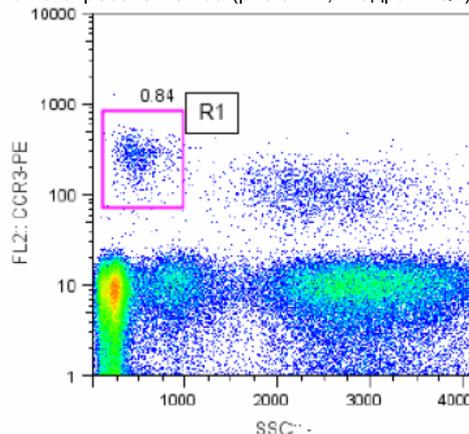


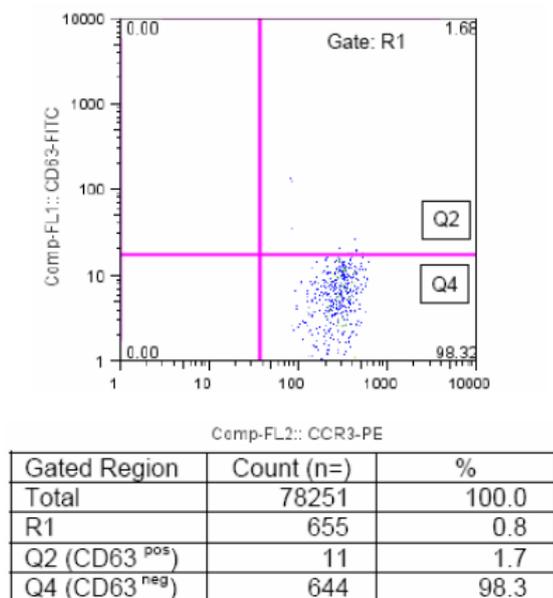
Рисунок 2. Выделение региона базофилов CCR3+/SSC^{low}

Рисунок 3. Фоновая проба пациента (только стимулирующий буфер)

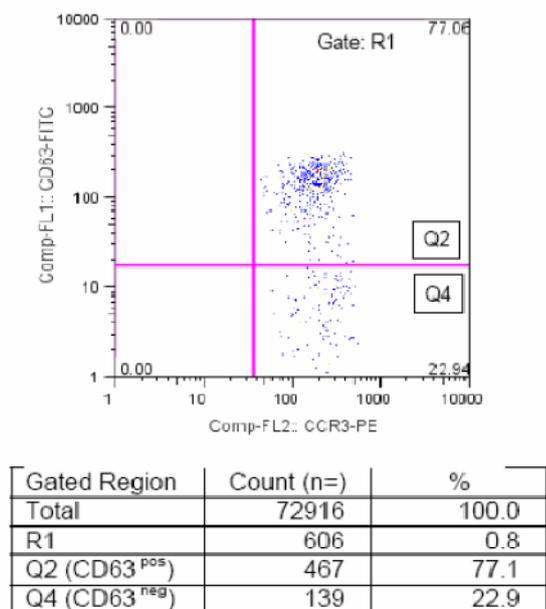


Рисунок 4. Стимуляция анти-FcεR1

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Полученные результаты могут быть искажены вследствие неправильной технической настройки цитометра, некорректной установки напряжения на каналах и цветовой компенсации, неправильного положения региона.

- Визуально контролируйте эффективность лизиса. При неполном лизисе эритроциты появляются на диаграмме светорассеяния в области лейкоцитов.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для оценки качества полученного результата можно использовать следующие относительные критерии:

а) **Появление трех дискретных популяций** (лимфоциты, моноциты, гранулоциты) на диаграмме светорассеяния - критерий качества образца крови (время сбора, хранение).

б) **Абсолютное количество базофилов** подсчитанных в процессе анализа указывает насколько правильно был выполнен тест. Достаточное количество базофилов (не менее 200) обеспечивает статистически значимые различия с контролем.

с) **Процент активированных базофилов.** В фоновой пробе обычно их не больше 5%. Однако иногда могут наблюдаться и более высокие значения (см. рис.5). Такая ситуация может наблюдаться в результате активации базофилов *in vivo* при недавнем контакте с аллергеном (например при аллергии на цветочную пыльцу в сезон цветения, забор крови сразу после еды или применения лекарства). Кроме того, повышение фона может наблюдаться и вследствие технических ошибок, таких как контакт базофилов *in vitro* с пластиком или реагентами, вызывающими неспецифическую активацию базофилов. Результат интерпретируется как положительный в случае, если индекс стимуляции специфическим аллергеном ≥ 2 (см. следующий раздел).

д) **Положительные контроли.** В набор включены два положительных контроля. Анти-FcεR1 воспроизводят ситуацию сшивки рецептора, вызываемую двойным связыванием IgE аллергеном. fMLP – трипептид, вызывающий активацию базофилов не иммунологическим путем. Если хотя бы в одном из контролей наблюдается более 10% активированных базофилов, то образец считается подходящим для исследования. Может наблюдаться отсутствие ответа на один из стимуляторов. По данным внутреннего исследования у 6,1% доноров отсутствовал ответ на анти-FcεR1, у 4,9% на fMLP. Однако образцов с негативным ответом на оба стимулятора не встречалось.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для достижения максимальной чувствительности и специфичности следует использовать несколько разные уровни cut-off для различных групп аллергенов. Основываясь на ряде исследований и расчетов, выполненных с помощью различных активационных тестов, Buhlmann рекомендует использовать следующие cut-off:

Ингаляторные аллергены:	$\geq 15\%$
Пищевые аллергены	$\geq 15\%$
Яды насекомых	$\geq 10\%$
Беталактамы антибиотики*	$\geq 5\%$
Анальгетики*	$\geq 5\%$
Пищевые добавки *	$\geq 5\%$

Лекарства и другие химические аллергены обычно дают более низкий процент активации, чем другие аллергены. В связи с этим следует использовать более низкие значения cut-off. Результат исследования считается положительным, если индекс стимуляции (ИС), вычисляемый как отношение процента стимулированных базофилов в стимулированной пробе к фоновой пробе должен быть ≥ 2 .

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Специфичность: Антитела анти-FcεR1 высокоспецифичные антитела (6, 7). CCR3 конститутивно экспрессируется на эозинофилах и базофилах (см. рис.2) и на небольшой части CD3+ лимфоцитов. Образцы крови от восьми доноров параллельно окрашивали анти-CCR3-PE и анти-CD3-AF647. Относительное количество CD3+ клеток в гейтированной популяции базофилов было 3,9% (см. табл.1).

При анализе 98 образцов крови здоровых доноров и пациентов с аллергиями медиана количества активированных базофилов в фоновых пробах составила 1,5% (95%, 1,2-1,7) (см. рис.5). В 6 образцах фоновая активация превысила 5%.

Захват базофилов: >500 базофилов в стимулированной пробе.

При анализе 102 образцов крови здоровых доноров и пациентов с аллергиями медиана количества захваченных базофилов составила 526 клеток (95%, 481-578 базофилов), окрашенных CCR3-PE.

Точность (фоновая проба): 16,2% CV.

Пробы из одного образца крови проинкубированы со стимулирующим буфером и проанализированы 20 раз.

Точность (положительный контроль): 5,4% CV

Пробы из одного образца крови проинкубированы с положительным контролем (STCON) и проанализированы 20 раз. Результаты представлены в таблице 2.

Вариации между операторами: 3,7-8,1% CV. Для образца крови здоровых доноров были исследованы с помощью Flow2 CAST® пятью операторами в течение одного дня. Положительные контроли STCON и fMLP были исследованы в дублях. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 1. Специфичность

n	16
Mean	3.85%
95% CI	2.52 – 5.18%
SD	2.50%
Median	3.10%
97.9% CI	1.70 – 5.54%

Таблица 2. Точность

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

MFI – средняя интенсивность флуоресценции.

Таблица 3. Вариации между операторами

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

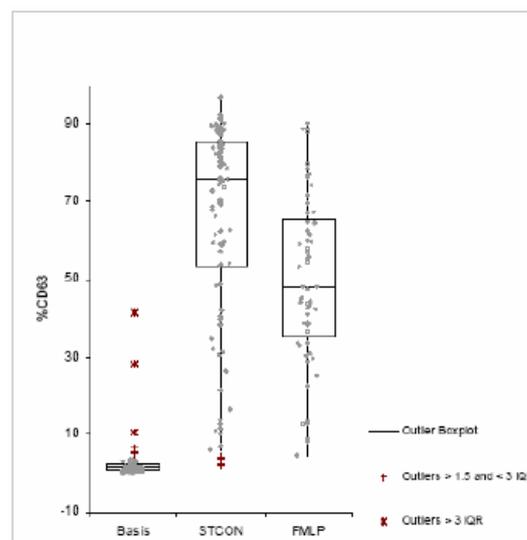


Рисунок 5. Положительные и отрицательные контроли здоровых доноров. Basis (фон) (n=98), STCON: положительный контроль анти-FcεR1 (n=98), fMLP: положительный контроль (n=61)

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «ДИАМЕБ»
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: (0342) 775122
 Тел/факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.ua
 www.diameb.ua

КРАТКИЙ ПРОТОКОЛ

Flow2 CAST®

Подготовка пробирок

↓

50 мкл стимулирующего буфера, контроля или аллергена
добавить 100 мкл стимулирующего буфера
добавить 50 мкл цельной крови



Осторожно перемешать

Добавить 20 мкл реагента для окраски

Осторожно перемешать и
инкубировать 15 мин
при 37°C (на водяной бане)

Добавить 2 мл лизирующего реагента, согретого до 18-28 °C

Инкубировать 5-10 мин при 18-
28 °CЦентрифугировать 5 мин при
500xg и удалить супернатант

Добавить 300 мкл отмывающего буфера*



Осторожно перемешать

Провести анализ на проточном цитометре (в течение 8 часов)

ВРЕМЯ ДО ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТА: ~ 1 ЧАС

* **Замечание:** В зависимости от марки проточного цитофлуориметра, количество отмывающего буфера может быть увеличено.