BD

Многопараметровая проточная цитометрия в онкогематологии

BioLine

Эксклюзивный дистрибьютор продукции
BD Biosciences в России – компания БиоЛайн

Проточная цитометрия стала незаменимым методом диагностики различных иммунопатологических состояний в клинической практике.

Востребованность цитометрических исследований объясняется их быстротой, точностью и надежностью.

Определение фенотипа каждой клетки в сочетании с анализом большого количества событий дают максимально полную информацию в кратчайшие сроки.

Диагностика онкогематологических заболеваний

Постановка диагноза в онкогематологии требует тонкого, точного и многостороннего исследования клеток опухолевого клона.

Современная классификация опухолевых заболеваний системы крови основана, прежде всего, на представлениях о пролиферации и дифференцировке миелоидных и лимфоидных клеток. Направление дифференцировки и стадия созревания характеризуются присутствием на поверхности и в цитоплазме клетки специфических антигенов*.

Прогноз заболевания

Многопараметровая проточная цитометрия позволяет не только поставить диагноз, но и оценить прогноз заболевания.

С каждым годом появляется все больше прогностических критериев при онкогематологических заболеваниях: наличие рецепторов к определенным цитокинам и ростовым факторам, наличие специфических рецепторов хоминга и маркеров апоптоза. Определение прогностически важных молекул требует также одновременного обнаружения маркеров опухоли.

Дополнительные сведения могут позволить оптимизировать выбранный курс лечения и оценивать эффективность проводимой терапии**.

Принцип метода проточной цитометрии

Одним из наиболее востребованных и широко применяемых методов определения поверхностных и цитоплазматических маркеров является проточная цитометрия.

Метод проточной цитометрии основан на детекции флюоресценции клеток, окрашенных моноклональными антителами, а также определении параметров прямого и бокового светорассеяния. Антитела специфично связываются с присутствующими в клетке антигенами.

Каждая молекула антител конъюгирована с флюорохромом, который флюоресцирует при возбуждении молекулы светом определенной длины волны. Флюорохромы светятся в узком диапазоне флюоресцентного спектра. Таким образом, флюоресценция клетки в определенной области спектра указывает на присутствие искомого антигена, а флюоресценция в нескольких областях, соответственно, на коэкспрессию нескольких антигенов.

*Krampera M, Perbellini O, Vincenzi C, Zampieri F, Pasini A, Scupoli MT, Guarini A, De Propris MS, Coustan-Smith E, Campana D, Foa R, Pizzolo G. Methodological approach to minimal residual disease detection by flow cytometry in adult B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Haematologica.2006; 91(8):1109-1112;
Pui CH, Robinsol LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. 2008;371(9617):1030-1043.

**Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms.
Blood. 2008;111(8):3941-3967.

Экспрессия опухолевых антигенов

Определение совокупности антигенов позволяет определить фенотип опухолевой клетки и установить ее линейную принадлежность.

Проточная цитометрия дает возможность не просто определить экспрессию определенных маркеров в массе опухолевых клеток, но показать коэкспрессию, то есть присутствие их на одной и той же клетке. Определение коэкспрессии важно при постановке диагноза в диагностически сложных случаях: при бифенотипических и биклональных лейкозах, лейкозах с аберрантной экспрессией антигенов*.

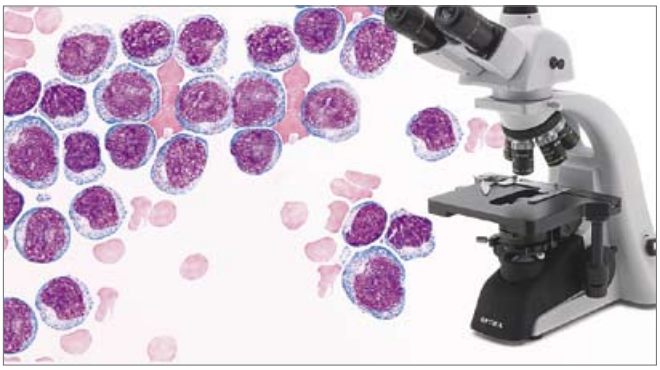
Определение области анализа

Ключевым моментом при цитометрическом анализе опухоли является корректное определение области анализа (гейтирование бластов).

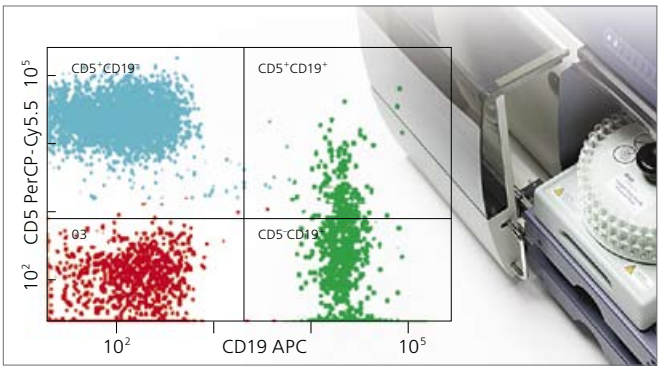
Выделенная область анализа должна минимально включать сохранные гемопоэтические ростки. Универсальным параметром для этой цели является степень экспрессии панлейкоцитарного маркера CD45. Зачастую бластные клетки имеют сниженную плотность CD45 на поверхностной мембране и не перекрываются с «нормальными» лимфоцитами. Оценка популяций, экспрессирующих CD45, позволяет сделать вывод также о степени сохранности «нормальных» гемопоэтических ростков. Экспрессия CD45 должна быть, таким образом, проанализирована в каждой тестируемой пробирке**.

Выбор цитофлюориметра

Для выполнения всех задач современного исследования рекомендуются проточные цитофлюориметры, оснащенные не менее, чем двумя лазерами и регистрирующие не менее 8 оптических параметров, включая, как минимум, 6 параметров флюоресценции***.



Морфологическая оценка опухолевых клеток методом микроскопии не позволяет сделать заключение о линейной принадлежности бластных клеток.
Число анализируемых событий не превышает 500.



Определение совокупности антигенов методом многопараметровой проточной цитометрии (до 18 маркеров на одной клетке одновременно) позволяет определить фенотип опухолевой клетки и установить ее линейную принадлежность.
Число анализируемых событий превышает 100 000 и позволяет исследовать редкие популяции, составляющие сотые доли процента (например, стволовые клетки)

* Rassenti LZ, Kipps TJ. Clinical utility of assessing ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. Cytometry B Clin Cytom. 2006;70(4):209-213.

** Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood. 2008;111(8):3941-3967.

*** Wood B. 9-color and 10-color flow cytometry in the clincal laboratory. Arch Pathol Lab Med. 2006;130:680-690.

Автоматизированная подготовка проб для проточной цитометрии

BD FACS™ Sample Prep Assistant (SPA)

Полностью автоматизированная подготовка образцов с использованием многоцветных онкогематологических панелей.

Выполняемые операции

- Внесение аликвот крови в пробирки для пробоподготовки
- Добавление комбинаций антител (до 9 в одну пробирку)
- Внесение лизирующего раствора
- Отслеживание времени инкубации на всех этапах

BD FACS™Lyse/Wash Assistant (LWA)

Прибор обеспечивает удаление лизированной эритроцитарной массы для максимально корректного анализа.

Использование BD FACS™Lyse/Wash Assistant (LWA) позволяет исключить одну из наиболее трудоемких процедур подготовки проб – отмывку проб методом центрифугирования.

Выполняемые операции

- Внесение лизирующего реагента
- Отмывка с использованием уникальной встроенной центрифуги
- Встроенные протоколы обслуживания прибора, возможность создания пользовательских протоколов лаборатории

BD Medimachine™

Проточная цитометрия – лучшее дополнение традиционной иммуногистохимии при типировании лимфом или исследовании солидных опухолей.

Устройство для гомогенизации тканей BD Medimachine™ позволяет быстро подготовить образец для исследования на проточном цитофлюориметре.

Специальные одноразовые ножи измельчают образец ткани, а с помощью фильтров можно выделить из гомогената ткани фракции клеток различного размера.

BD Medimachine™	прибор для гомогенизации образцов
Medicons™	ножи для гомогенизации образцов
Filcons™	фильтры для фильтрации суспензии

Проточный цитофлюориметр

BD FACSCanto™ II

Современная, технически совершенная система для многопараметрового анализа любых биологических материалов: крови, костного мозга, ликвора, сыворотки и гомогенатов тканей.

Оптическая система

- Используемые лазеры поддерживают работу с флюорохромами на различных длинах волн: 488 нм, 633 нм. Конструкция прибора предусматривает возможность установки третьего лазера 405 нм, что дает существенное преимущество в выборе флюорохромов
- Поддерживаются современные многопараметровые методики иммунофенотипирования с использованием до 10 оптических параметров одновременно, в том числе до 8 параметров флюоресценции

Автоматизация

- Автоматическая калибровка прибора и настройка компенсации с использованием удобных калибровочных материалов для любых реагентов по выбору пользователя (частицы BD FACS 7-color Setup Beads, BD CompBeads или окрашенные одноцветными реагентами контрольные образцы клеток)
- Автоматические протоколы для запуска прибора, завершения работы, обслуживания прибора
- Модуль BD FACS™Loader для автоматической подачи проб из пробирок и BD™ HTS для подачи проб из планшетов

Обработка данных

- Цифровая обработка сигнала, формат файлов FCS3.0
- Базовое программное обеспечение BD FACSDiva™ универсального назначения и специализированная клиническая программа BD FACSCanto™ для иммунофенотипирования
- Базы данных программного обеспечения, объединяющие настройки, данные образцов, результаты анализа, алгоритмы, исследование однотипных образцов
- Дополнительные программы: ModFit™ для ДНК-цитометрии, FCAPArray™ для мультиплексных технологий определения аналитов в растворах (цитокины, факторы роста)

Варианты конфигураций

	2 лазера		3 лазера
	базовая	расширенная	
количество флюоресцентных каналов	6	8	8
используемые флюорохромы	FITC, PE, PerCP/ PerCPCy5.5, PE-Cy7, APC, APC-Cy7	FITC, PE, PerCP/ PerCPCy5.5, PE-Texas Red, PE-Cy7, APC, APC-Cy7, Alexa700	FITC, PE, PerCP/ PerCPCy5.5, PE-Cy7, APC, APCCy7, Pacific Blue, AmCyan

Серия реагентов BD Onkomark™

Маркер для скрининговых исследований	CD3/MPO/CD79a	
Лимфоидные маркеры	**Т-клеточные** CD2/ CD7/ CD3 CD4/ CD25/ CD3 CD8/ CD56/ CD3 CD57/ CD16/ CD3 Флюорохромы:FITC/PE/PerCP	**В-клеточные** Kappa/Lambda/ CD 19 CD5/ CD10/ CD19 CD7/ CD23/ CD19 CD103/ CD22/ CD20
Миелоидные маркеры	CD7/ CD33 CD14/ CD64 CD15/ CD34 CD15/ CD117 CD45/ GlyA/CD41a HLA-DR/ CD13 HLA-DR/ CD34 Флюорохромы: FITC/PE/PerCP	

Серии реагентов BD Onkomark™ – готовые двух- и трехцветные комбинации антител для анализа экспрессии линейно-ассоциированных и прогностически важных молекул на мембране и в цитоплазме малигнизированных клеток.

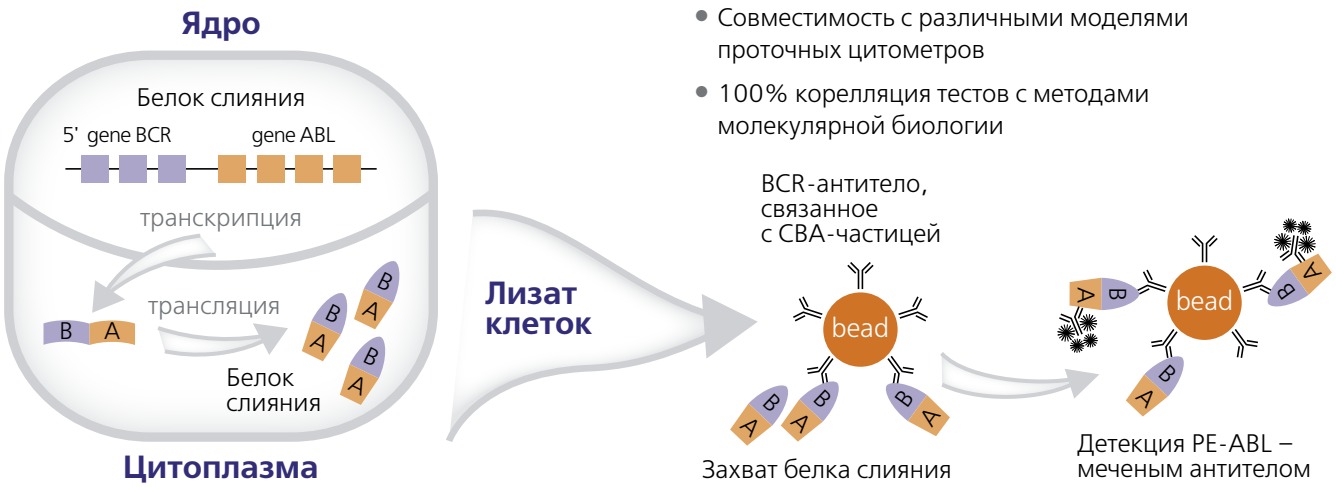
- Работа с образцами костного мозга и периферической крови
- Определение линейности и степени дифференцировки опухолевого клона
- Комбинации исследуемых антигенов в соответствии с рекомендациями международных комитетов
- Определение минимальной остаточной болезни

Система реагентов BCR–ABL Protein Kit

BCR–ABL Protein Kit	набор реагентов для определения растворимого химерного белка
Fusion Protein Buffer Kit	набор вспомогательных буферов

Набор реагентов BCR-ABL Protein Kit позволяет методом проточной цитометрии определить химерный белок BCR-ABL. Белок BCR-ABL – продукт транслокации (9;22) у больных ОЛЛ и ХМЛ.

- Использована технология CBA – анализируемый белок связан с флюоресцирующей частицей.
- Быстрое получение результата
- Не требуется дополнительного программного обеспечения
- Совместимость с различными моделями проточных цитометров
- 100% корелляция тестов с методами молекулярной биологии



BD предлагает широкий спектр реагентов для составления 6-8 цветных панелей для онкогематологии

антитело	доступные метки
CD2	FITC, PE, PE-Cy7, APC
CD3	AmCyan, Pacific Blue, APC, APC-Cy7, APC-H7, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, PerCP, PerCP-Cy5.5, Biotin, Alexa Fluor®488, Alexa Fluor®647, Alexa Fluor®700
CD4	AmCyan, Pacific Blue, APC, APC-Cy7, APC-H7, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, PerCP, PerCP-Cy5.5, Biotin, Alexa Fluor®488, Alexa Fluor®647, Alexa Fluor®700
CD5	APC, FITC, PE, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5
CD7	FITC, PE, PE-Cy5
CD8	AmCyan, Pacific Blue, APC, APC-Cy7, APC-H7, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, PerCP, PerCP-Cy5.5, Biotin, Alexa Fluor®488, Alexa Fluor®647, Alexa Fluor®700
CD9	APC, FITC, PE, PerCP-Cy5.5
CD10	APC, FITC, PE, PE-Cy7
CD11b	Pacific Blue, APC, APC-Cy7, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, Biotin, Alexa Fluor®488
CD13	PE, PE-Cy7, APC
CD14	Fluor®488, Alexa Fluor®700, APC, FITC, Pacific Blue, PE, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5, APC, APC-Cy7, APC-H7, FITC, PE, PerCP
CD15	APC, FITC, PE
CD16	Pacific Blue, APC-Cy7, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5, Biotin, Alexa Fluor®647
CD19	AmCyan, APC, APC-Cy7, APC-H7, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, PerCP, PerCP-Cy5.5, Biotin, Alexa Fluor®488, Alexa Fluor®700
CD20	APC, APC-Cy7, APC-H7, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, PerCP, PerCP-Cy5.5
CD22	APC, FITC, PE, PE-Cy5
CD25	APC, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, APC-Cy7
CD33	APC, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5
CD34	APC, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5
CD38	APC, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5
CD41a	APC, FITC, PE, PE-Cy5, PerCP-Cy5.5
CD45	AmCyan, APC, APC-Cy7, APC-H7, Biotin, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, PerCP, PerCP-Cy5.5
CD56	APC, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, Biotin, Alexa Fluor®488, Alexa Fluor®647, Alexa Fluor®700
CD57	FITC, Biotin
CD79a	APC, PE, PerCP-Cy5.5
CD79b	APC, FITC, PE, PE-Cy5
CD103	FITC, PE
CD117	APC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5
CD138	FITC, PE
CD235	APC, FITC, PE, PE-Cy5
FMC7	FITC
HLA–DR	APC, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, Biotin, APC-H7, APC-Cy7, PerCP, PerCP-Cy5.5
TdT	APC, FITC, PE

Данная таблица содержит наиболее часто используемые в онкогематологии маркеры.
По специальному запросу возможно изготовление антител с необходимой пользователю меткой.
Для дополнительной информации вы можете обратиться к сертифицированным специалистам компании «БиоЛайн».

Подразделение BD Biosciences компании Becton Dickinson and Company (BD) является лидером в производстве приборов и реагентов для проточной цитометрии. Разработка и внедрение в производство инновационных технологий в области проточной цитометрии. Разработки компании — «золотой стандарт» цитометрических исследований в области иммунологии, онкогемоталогии, клеточной биологии, фармацевтике и исследовании стволовых клеток.

www.bdbiosciences.com

Эксклюзивный дистрибьютер продукции BD Biosciences в России — компания БиоЛайн

Компания БиоЛайн осуществляет оснащение, технический сервис, обучение и консультативную поддержку диагностических и научно-исследовательских лабораторий медицинского и биологического профиля.

Авторизованная служба технического сервиса лабораторного оборудования

- Инсталляция приборов и оборудования, обучение работе с прибором
- Гарантийное и постгарантийное сервисное обслуживание
- Консультации специалистов на всех этапах работы
- Оперативный выезд специалиста технического сервиса к Заказчику для срочного выявления и устранения неисправности приборов

ООО «БиоЛайн»
197101, Россия, Санкт-Петербург
Петроградская наб., 36 А
тел.: (812) 320 49 49, факс: (812) 320 49 40
e-mail: main@bioline.ru, www.bioline.ru

Москва, тел.: 8 800 555 49 40
Новосибирск, тел.: (383) 227 09 63
Екатеринбург, тел.: (343) 380 23 48
Нижний Новгород, тел.: (831) 278 61 47
Пятигорск, тел.: (8793) 36 37 06

ДП «БиоЛайн Украина»
03062, Украина, Киев
пр. Перемоги, 67
тел.: +38 (044) 200 89 37
факс: +38 (044) 200 89 20
e-mail: info@bioline.kiev.ua

Единый бесплатный номер сервисной службы для всех регионов России: 8 800 333 00 49

ГРУППА КОМПАНИЙ **БИОЛАЙН**

Мы делаем лабораторный мир лучше!