

**Стандартизация
иммунологических
исследований и контроль
качества в проточной
цитометрии.**

Хайдуков С.В., д.б.н.

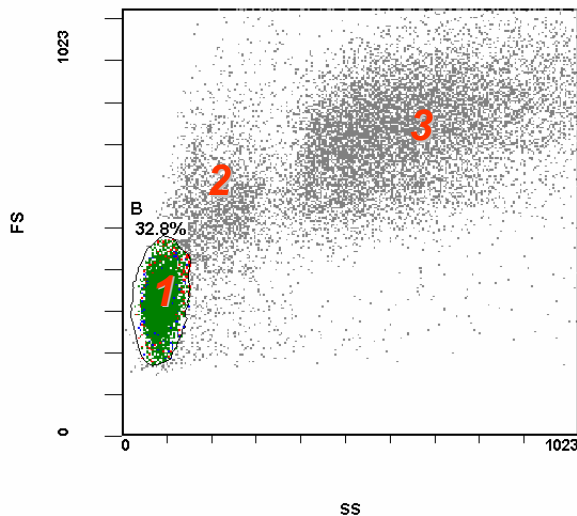
Что может привести к некачественному анализу?

- 1. Отсутствие правильной настройки проточного цитометра**
- 2. Некачественные или просроченные реагенты**
- 3. Ошибки при подготовке образца для анализа**

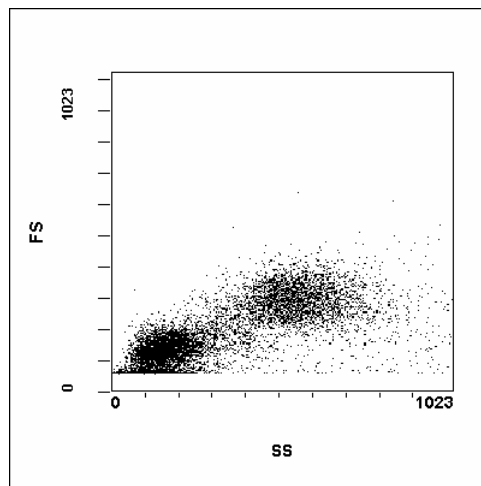
Что должно быть общим при всех анализах иммунофенотипа пациентов.

- **Стандартный набор анализируемых маркеров (допускается расширение панели моноклональных антител для более полной характеристики исследуемого образца)**
- **Стандартная настройка проточного цитометра**
- **Стандартный отбор образца для анализа**
- **Стандартная процедура пробоподготовки**
- **Стандартный анализ с использованием контроля качества и контрольных сумм**

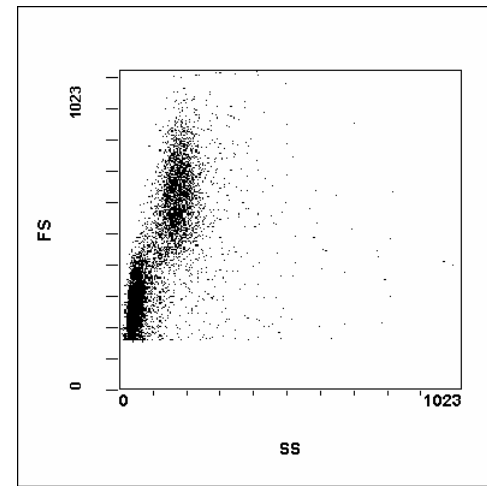
Установки светорассеяния



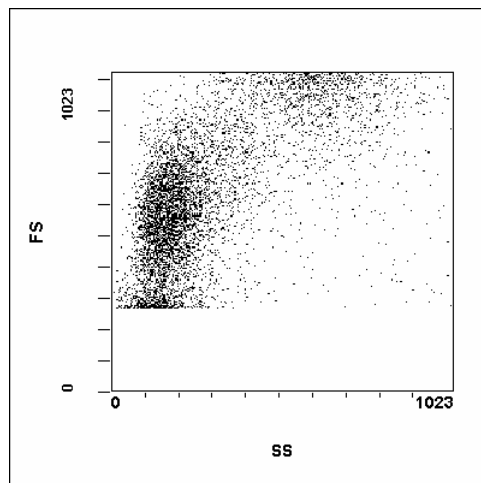
1. Лимфоциты
2. Моноциты
3. Гранулоциты



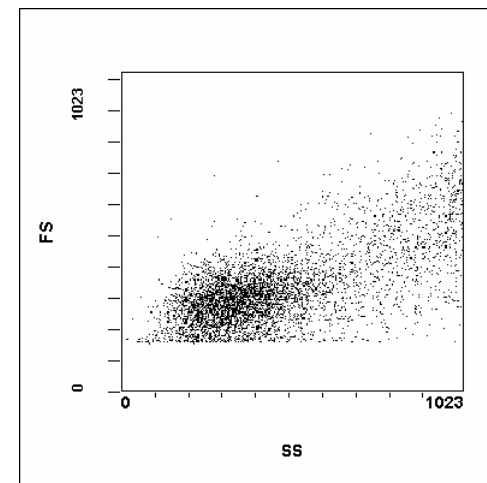
Низкое напряжение на PMT FS



Низкое напряжение на PMT SS



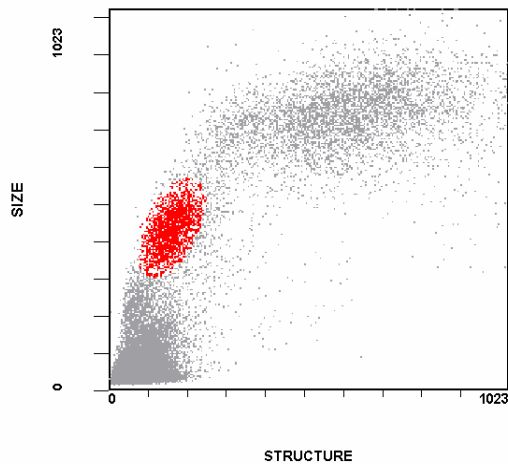
Высокое напряжение на PMT FS



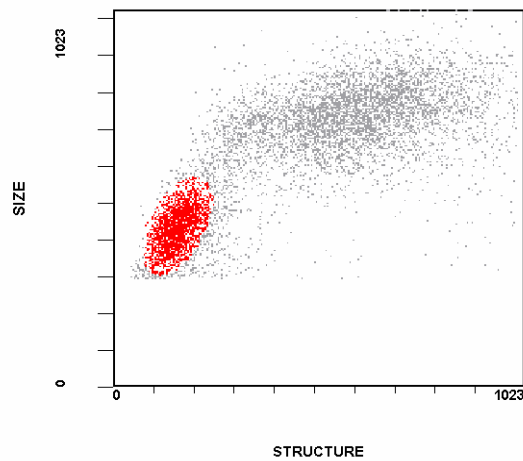
Высокое напряжение на PMT SS

Дискриминатор

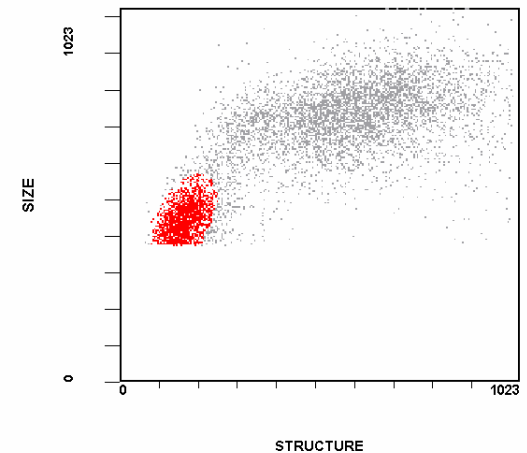
*Заниженное значение
дискриминатора*



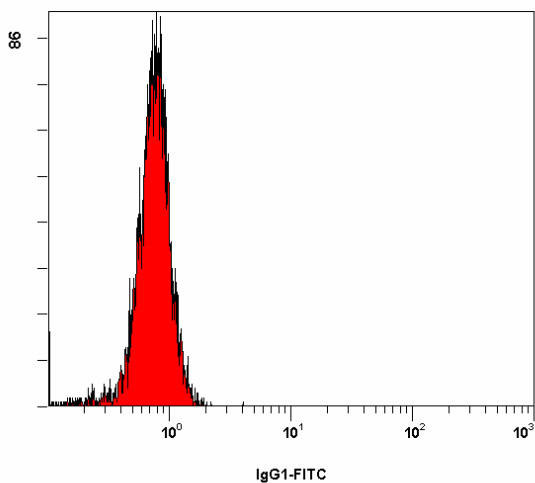
*Оптимальное значение
дискриминатора*



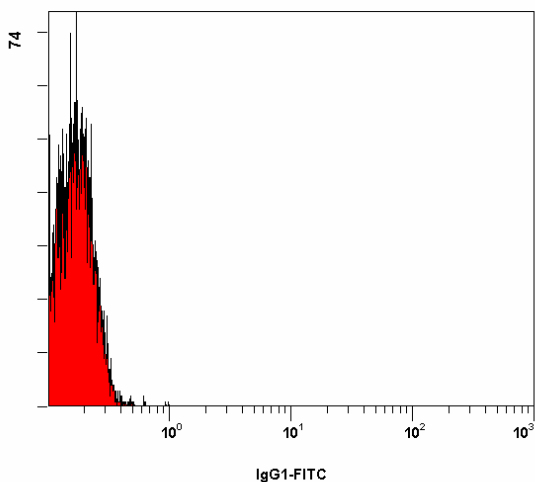
*Завышенное значение
дискриминатора*



Установки напряжения на фотоэлектронных умножителях (РМТ)



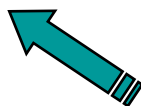
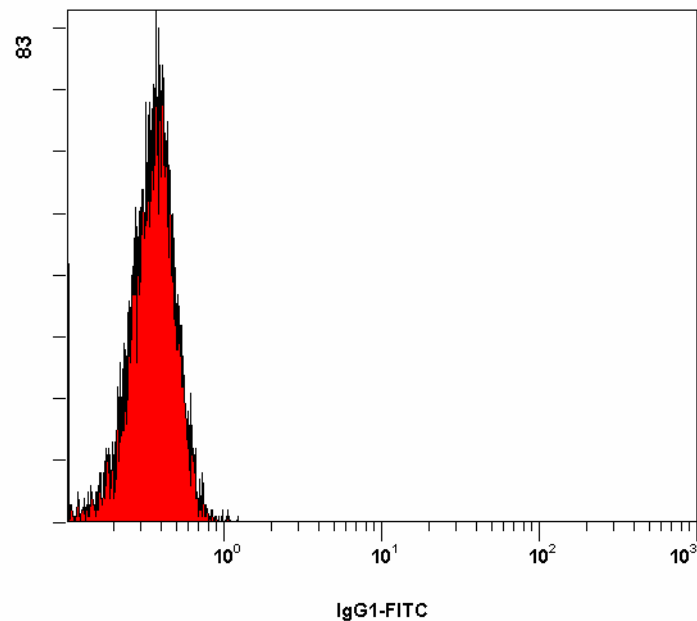
Высокое напряжение на РМТ



Низкое напряжение на РМТ

Хайдуков С.В.

Оптимальное напряжение на РМТ



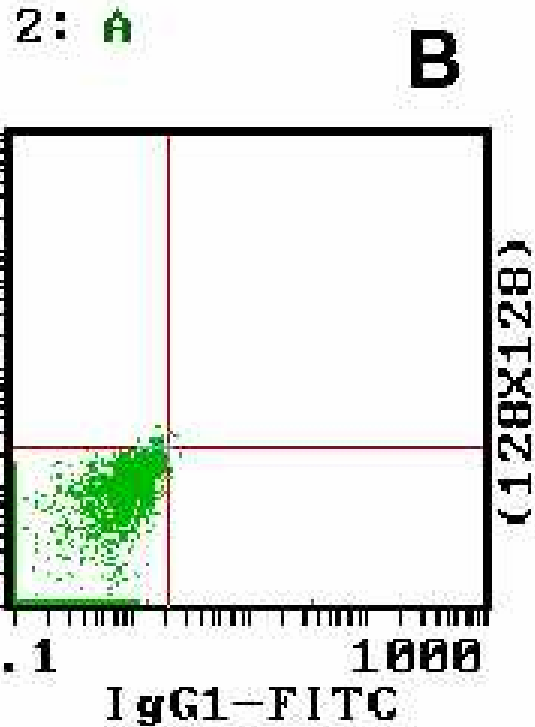
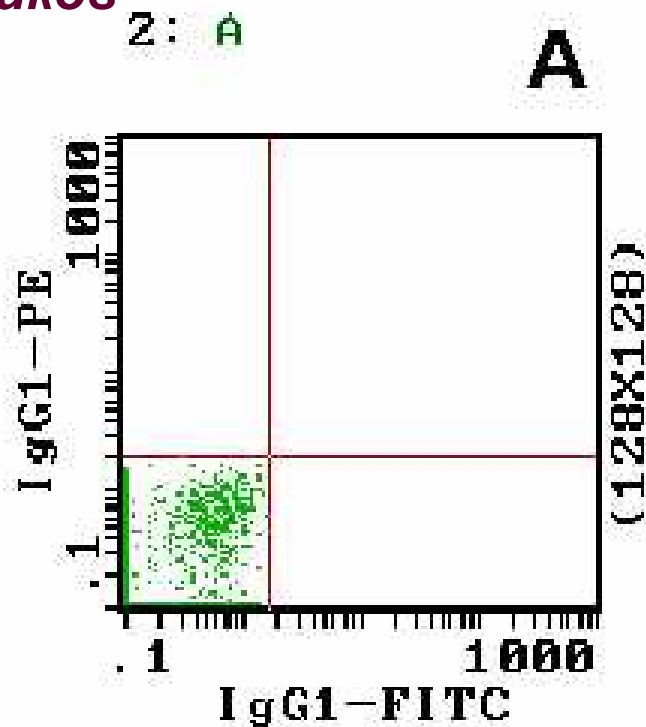
Аутофлуоресценция

A = до

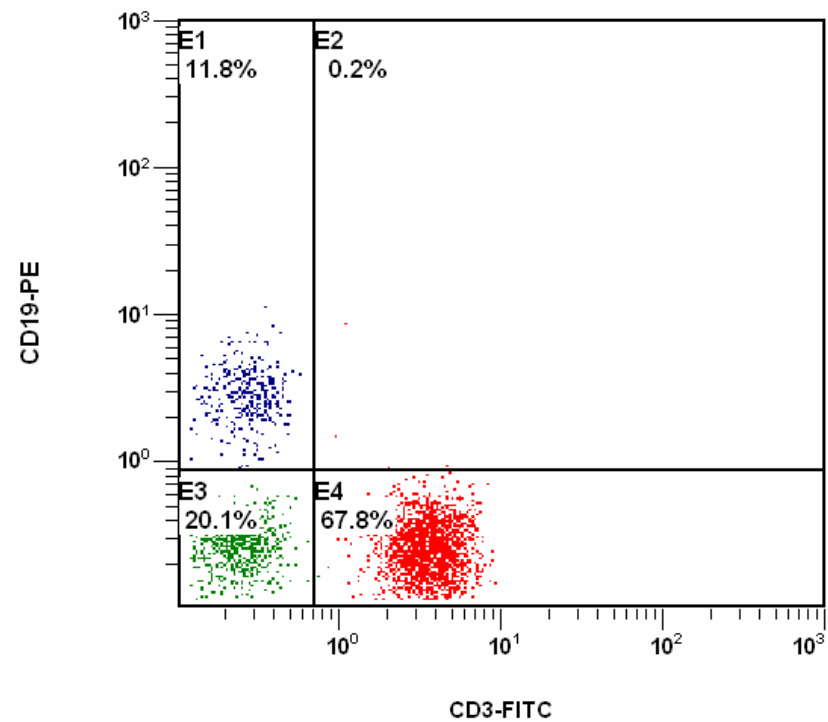
B = после

антибиотиков

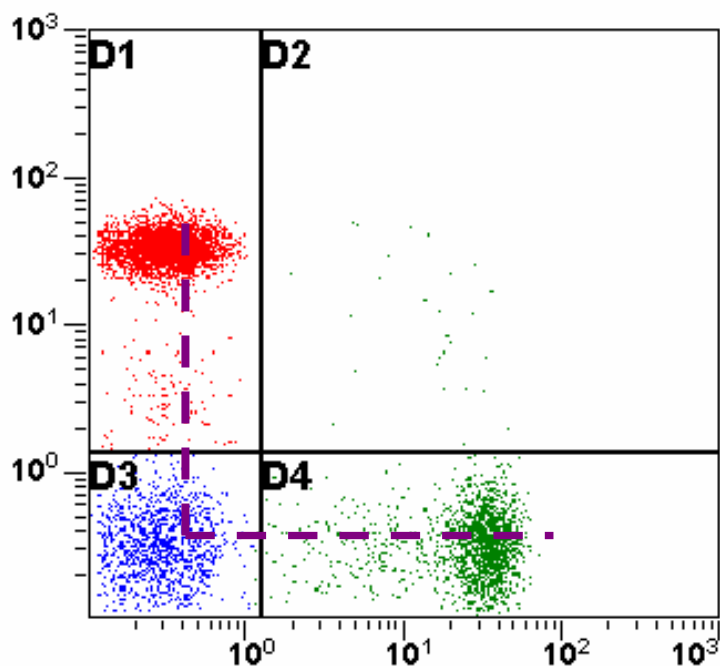
Индукцированная
лекарствами



Компенсация I



Компенсация II



FL1

Первое правило

Компенсация 1

FL1 против FL2

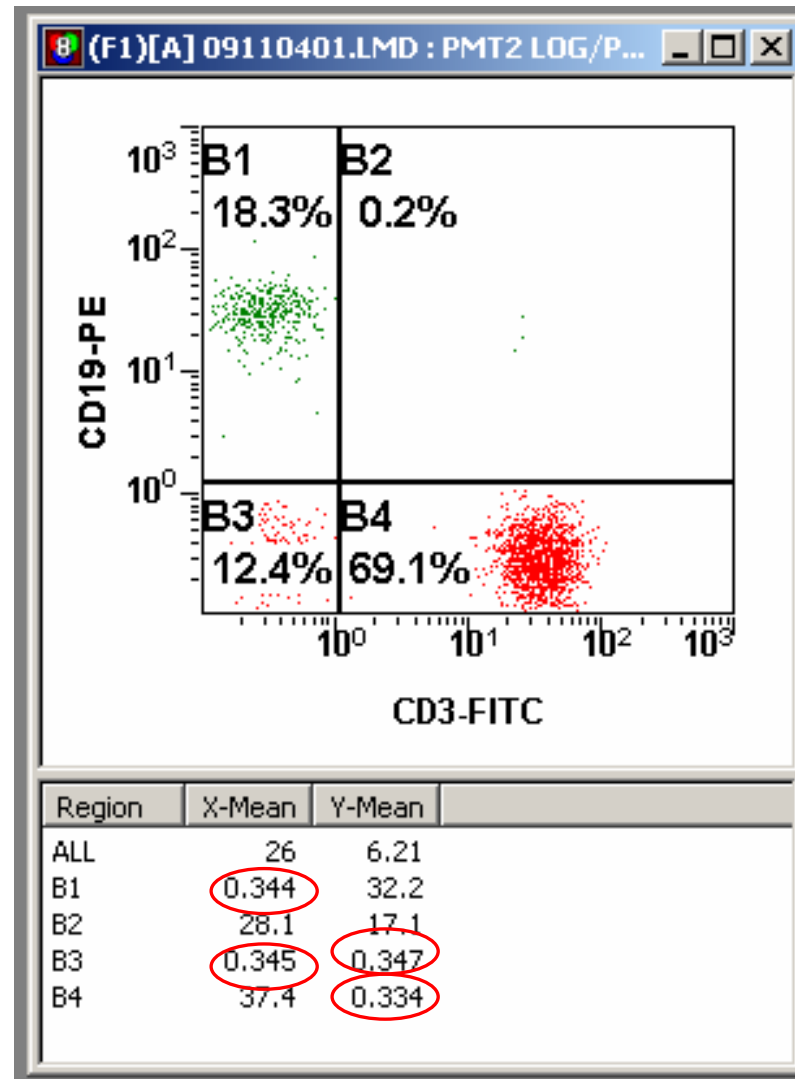
Mean-канал региона D3 = D4

Компенсация 2

FL2 против FL1

Mean-канал региона D1 = D3

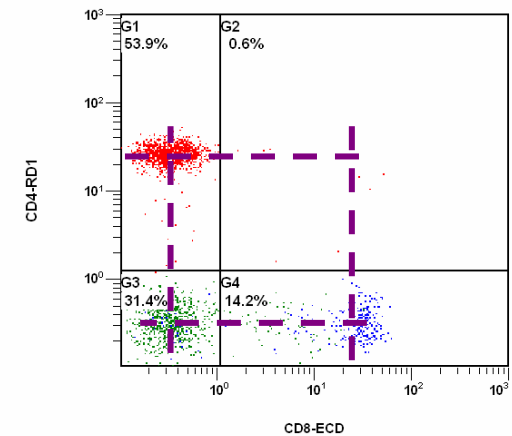
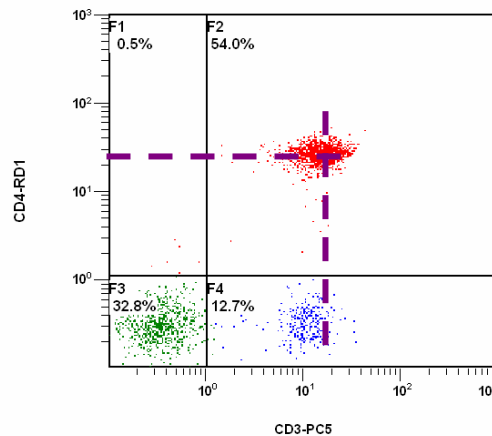
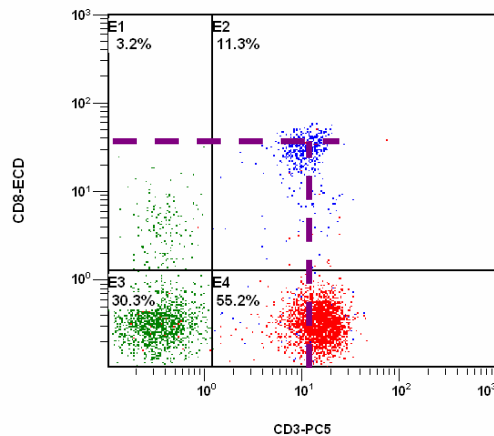
Как себя проверить?



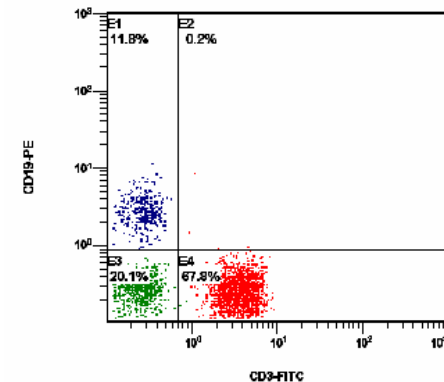
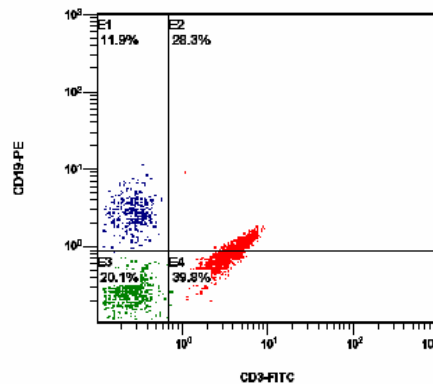
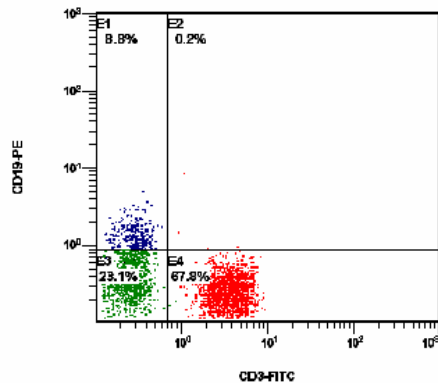
Компенсация III

Второе правило

Если мысленно нарисовать линии из центров областей позитивных клеток, то они должны быть приблизительно параллельны осям X и Y или должен образоваться прямоугольник.



Взаимосвязь между усилением напряжения на РМТ и компенсацией

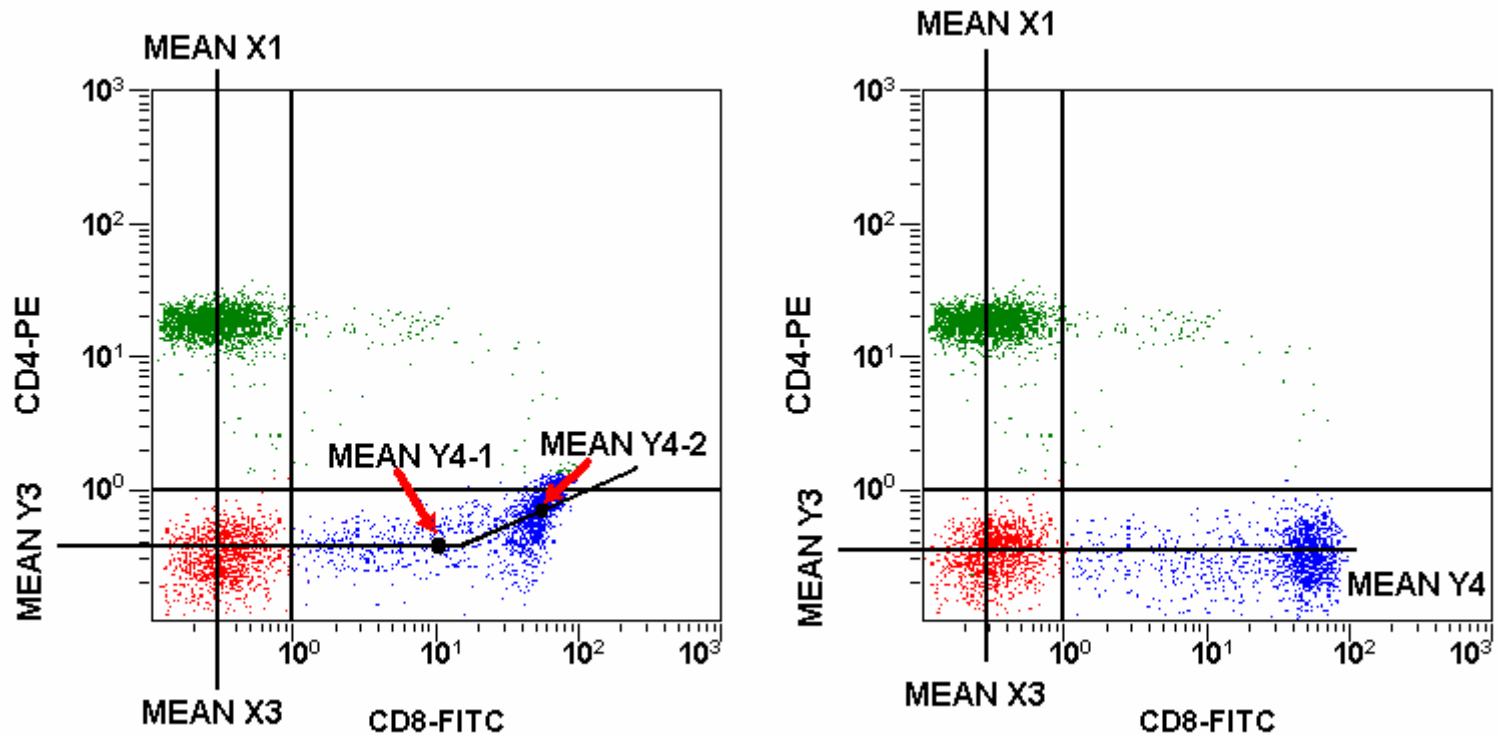


Не достаточное напряжение на РМТ – заниженные результаты анализа

Повышение напряжение на РМТ без коррекции компенсации – не достоверные результаты анализа

Повышение напряжение на РМТ и коррекция компенсации – достоверные результаты анализа

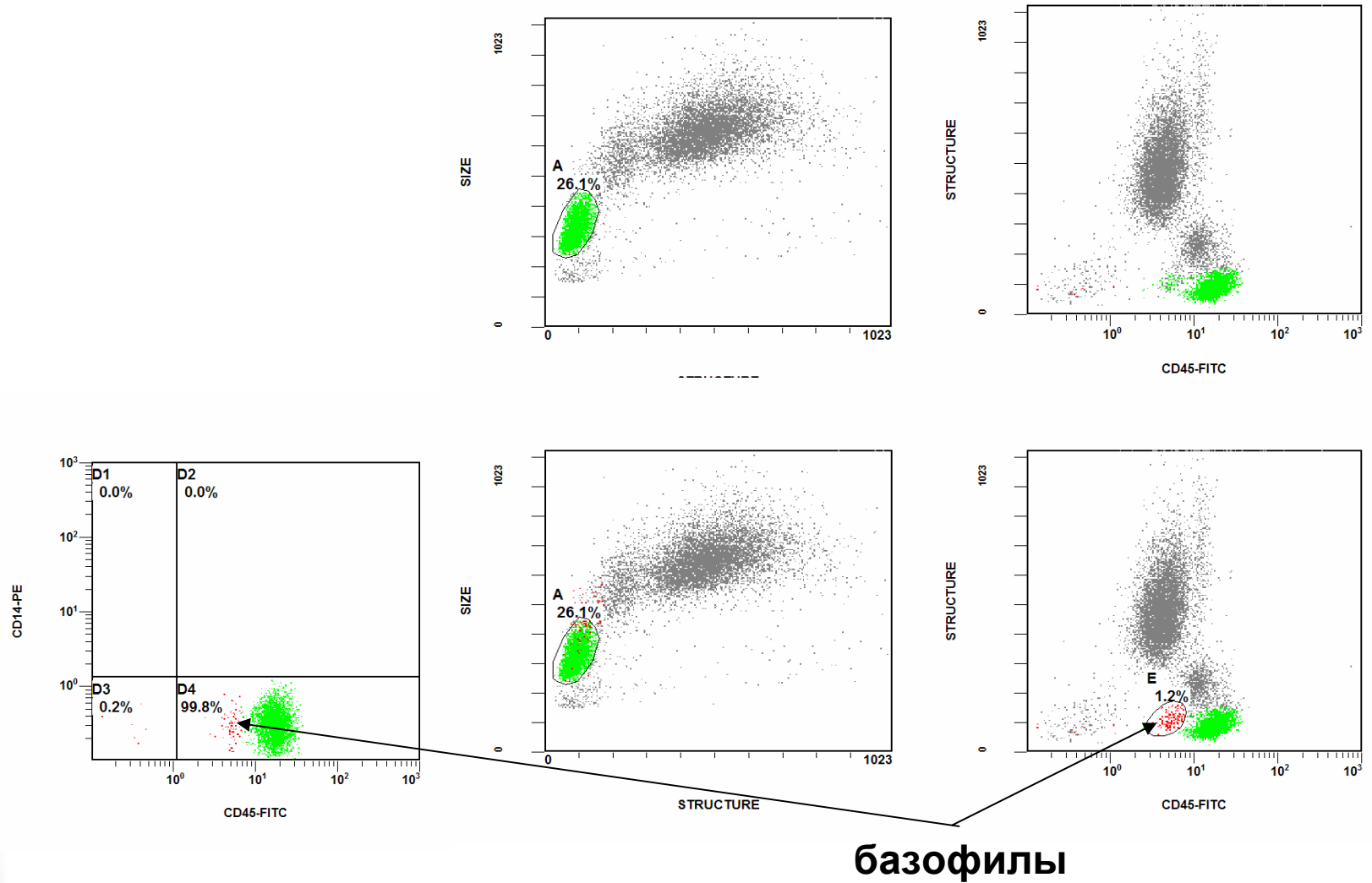
Взаимосвязь между плотностью экспрессии маркеров и компенсацией



Проблемы возникающие при гейтировании по морфологическим признакам - Причины

- **Базофилы**
- **Неадекватный лизис эритроцитов**
- **Мертвые моноциты**
- **Дегранулированные гранулоциты**
- **Незрелые красные клетки (ретикулоциты)**
- **Опухолевые клетки**
- **Агрегация тромбоцитов**
- **Переливание плазмы**
- **Контаминация бактериями или микоплазмой**
- **Низкое напряжение на FSC и SSC**
- **Перекрестное загрязнение образцов**

Выбор зоны анализа лимфоцитов

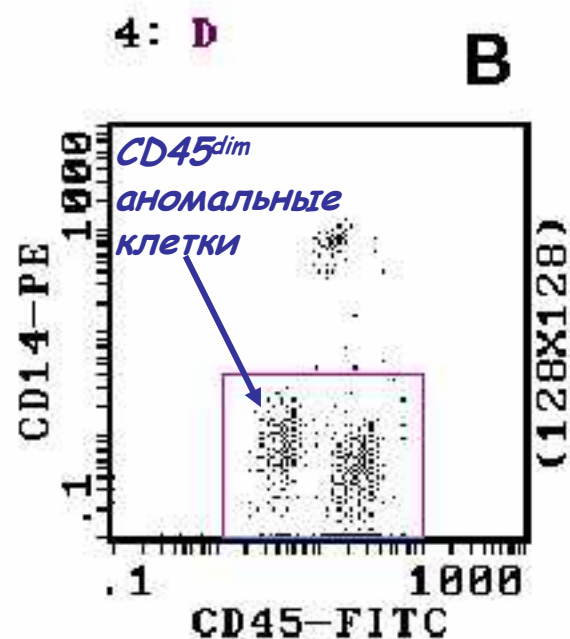
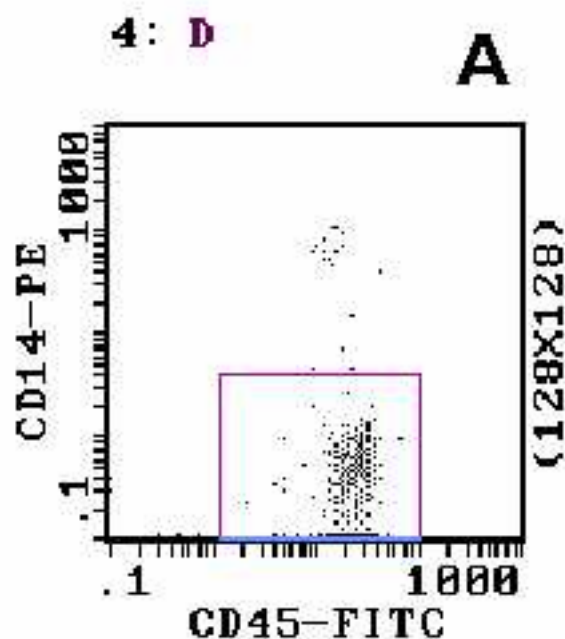


Зона анализа для лимфоцитов

В образце пациента с гематологическим расстройством лимфоциты экспрессирующие $CD45^{dim}$ попадают в область нормальных лимфоцитов определяемую по морфологическим признакам.

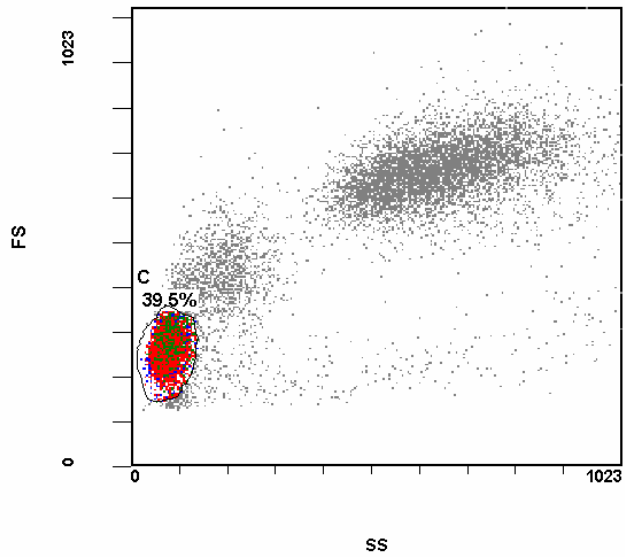
А = нормальная кровь

В = CLL

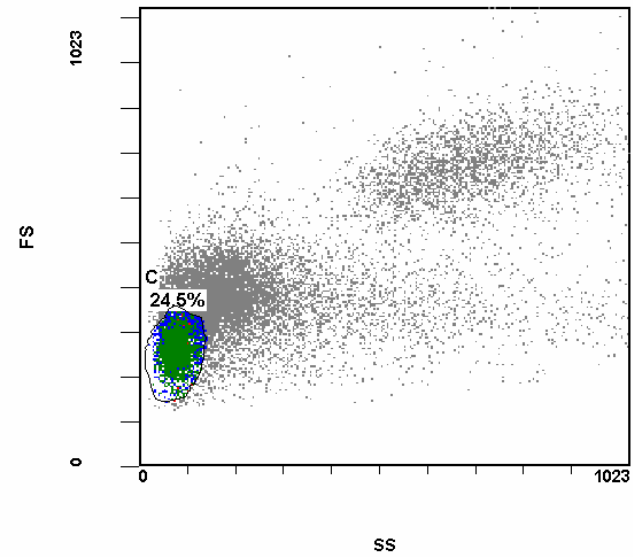


Неполный лизис эритроцитов

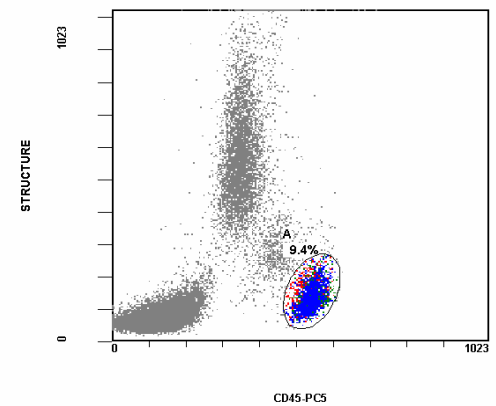
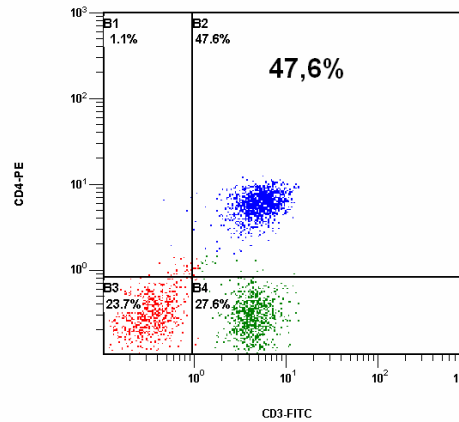
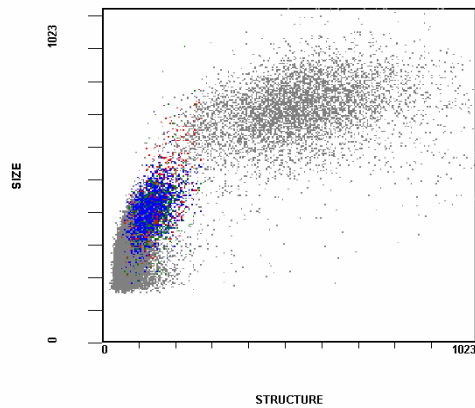
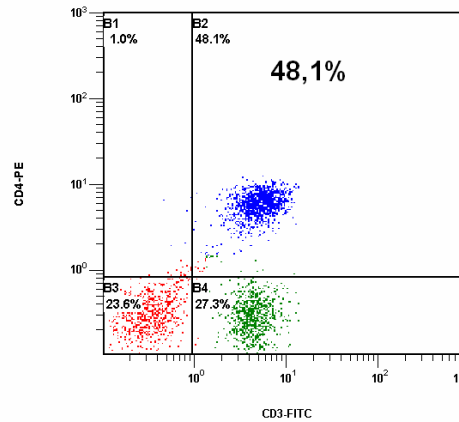
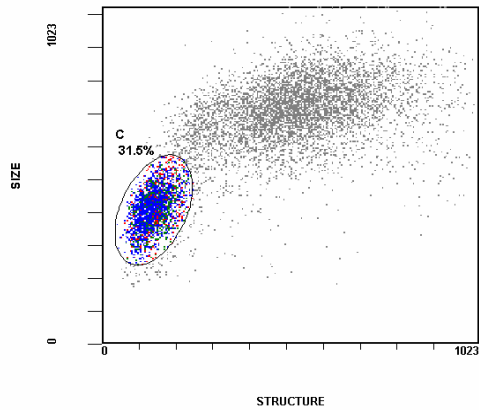
(F1)[Ungated] Z0002216.LMD : SS/FS



(F4)[Ungated] Z0002221.LMD : SS/FS



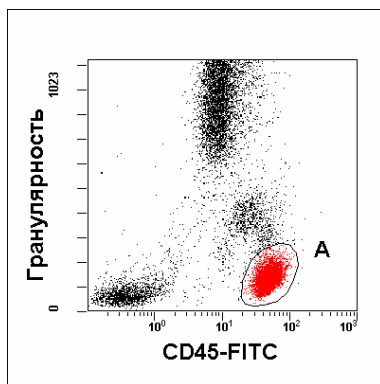
Пример использования гейтирования по CD45 при неполном лизисе эритроцитов



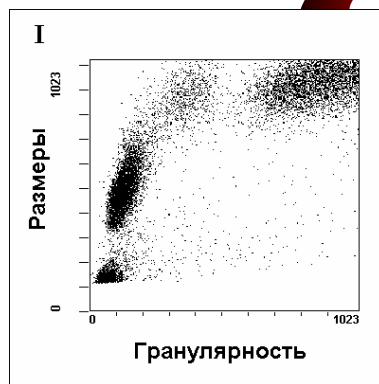
Алгоритм выбора зоны анализа лимфоцитов при использовании логических ограничений по CD45 и морфологическим параметрам.

Последовательное внесение логических ограничений в морфологическую гистограмму I.

Выделение зоны лимфоцитов по CD45



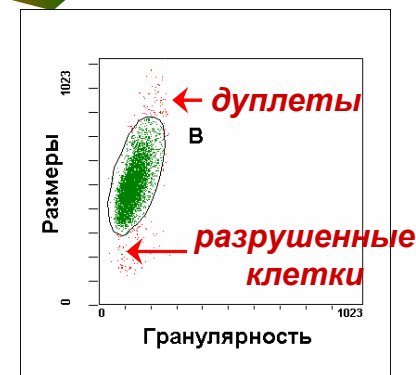
Первое логическое ограничение A



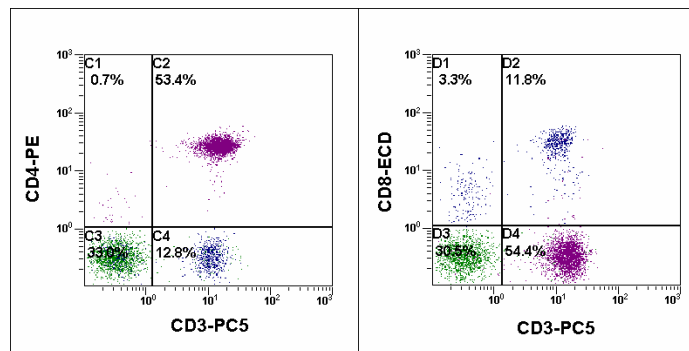
Лимфоциты CD45^{bright}



Второе логическое ограничение B

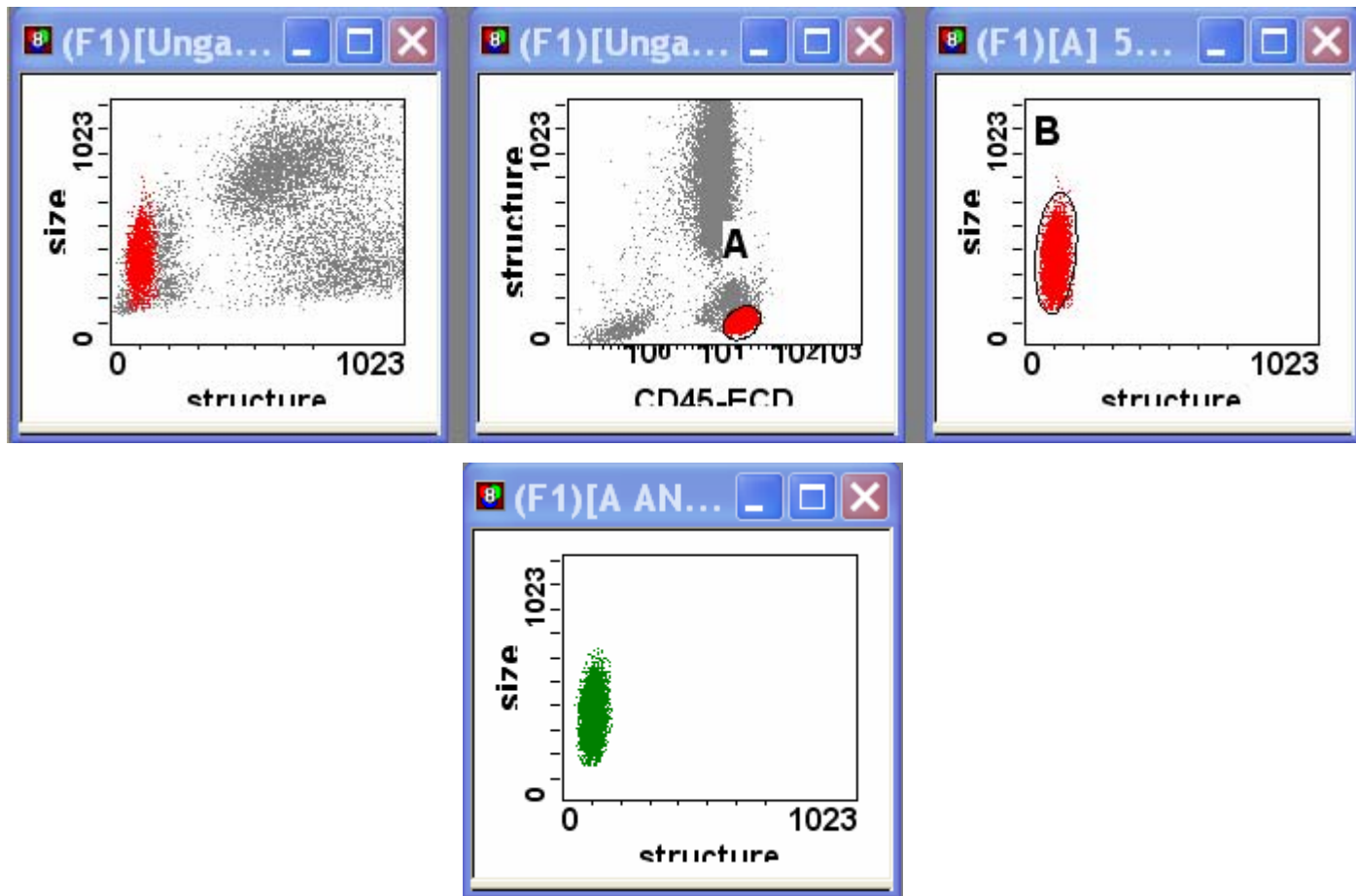


Анализ клеток одновременно попадающих в зоны A и B



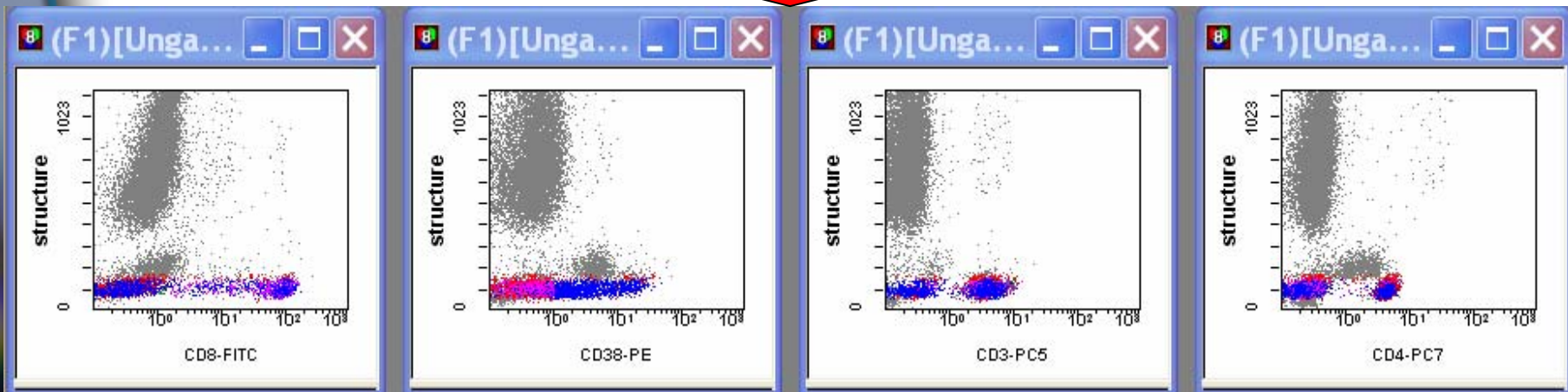
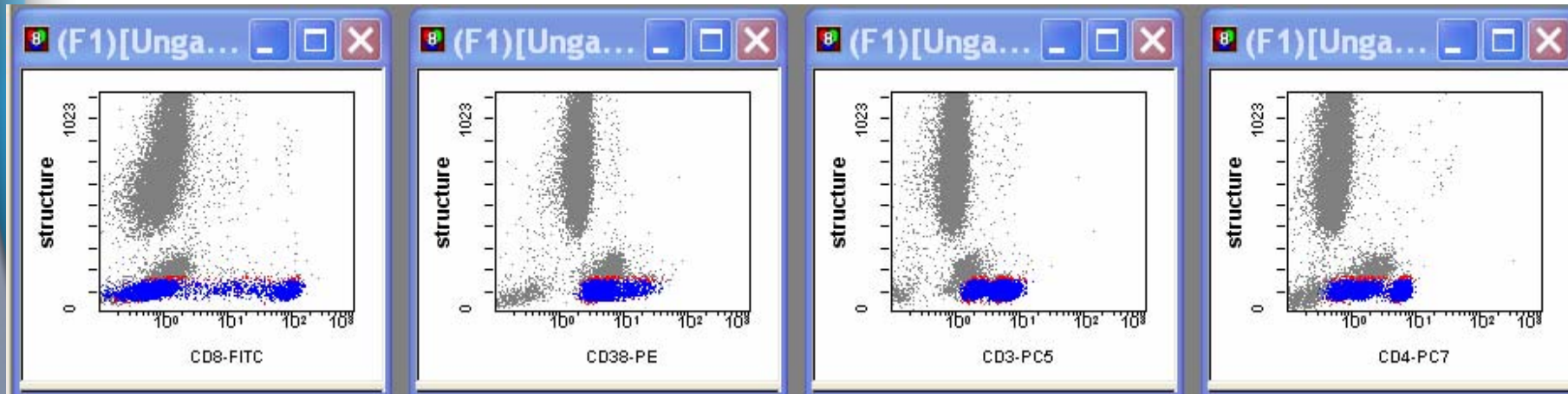
Алгоритм компенсации при многоцветном анализе с использованием CD45 – ручной вариант (шаг 1)

Выбор зоны анализа лимфоцитов по алгоритму для CD45.



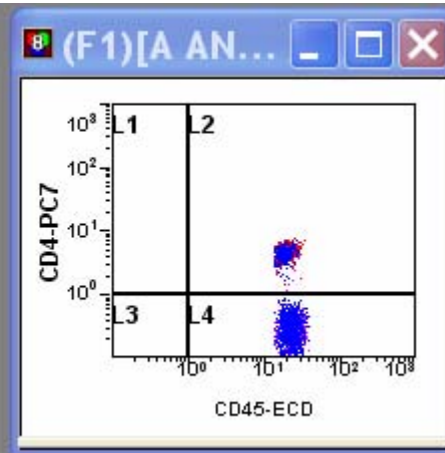
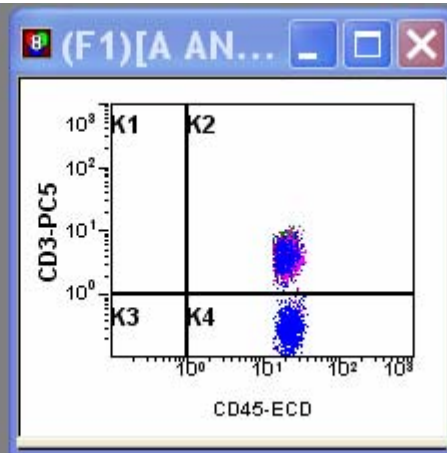
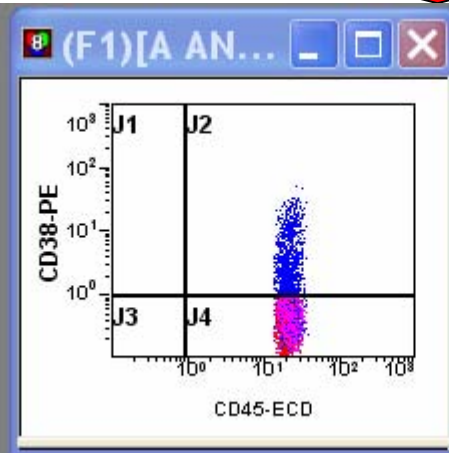
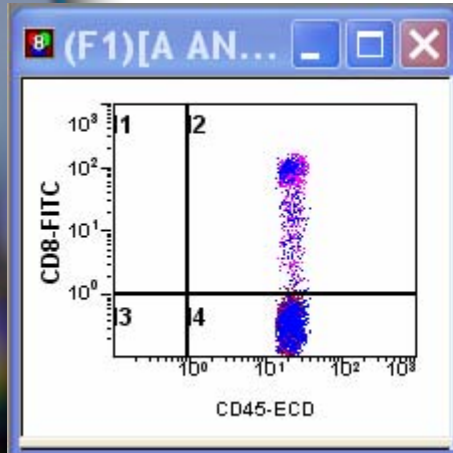
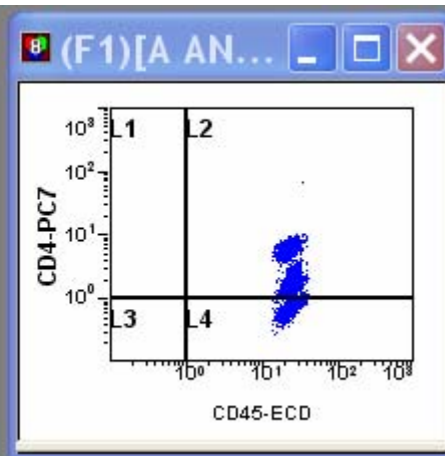
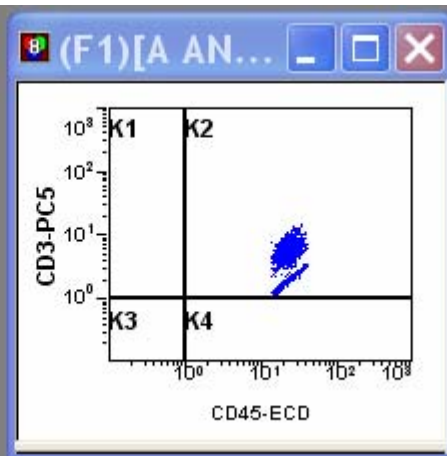
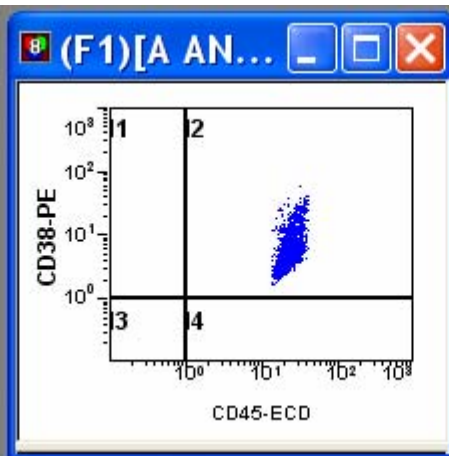
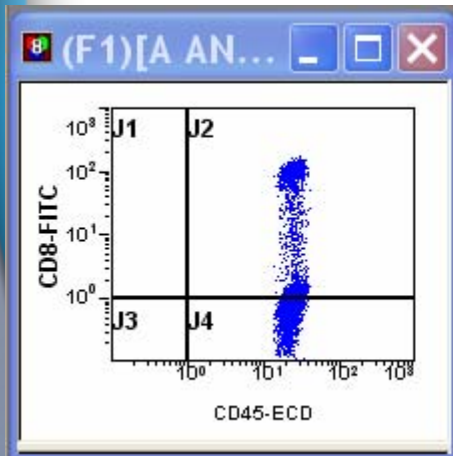
Алгоритм компенсации при многоцветном анализе с использованием CD45 – ручной вариант (шаг 2)

Настройка чувствительности каналов флуоресценции (негативные клетки должны находиться в 1-ой декаде)



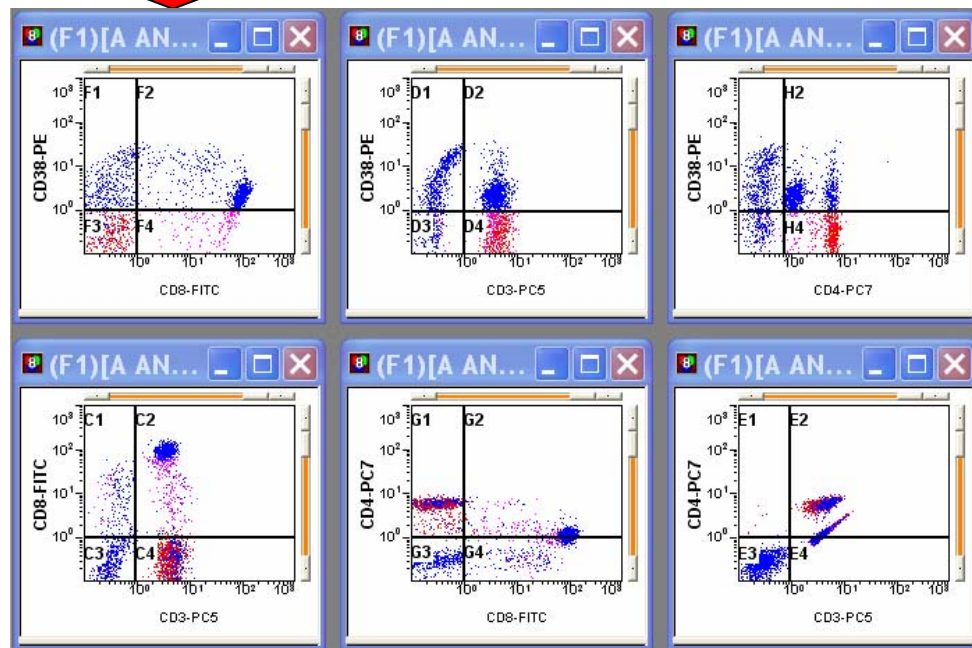
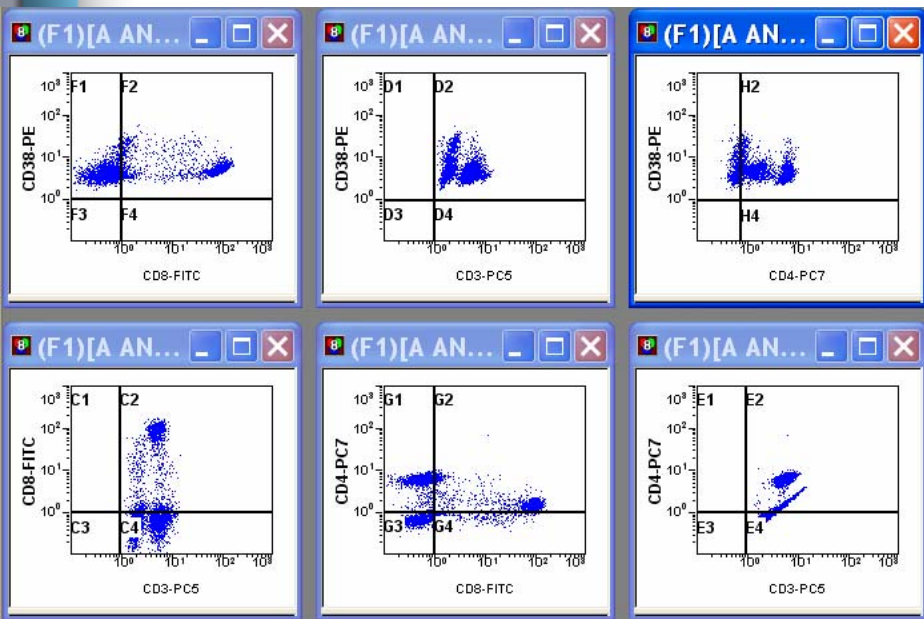
Алгоритм компенсации при многоцветном анализе с использованием CD45 – ручной вариант (шаг 3)

Компенсация всех флуорохромов против CD45
(негативные клетки должны находиться в 1-ой декаде)



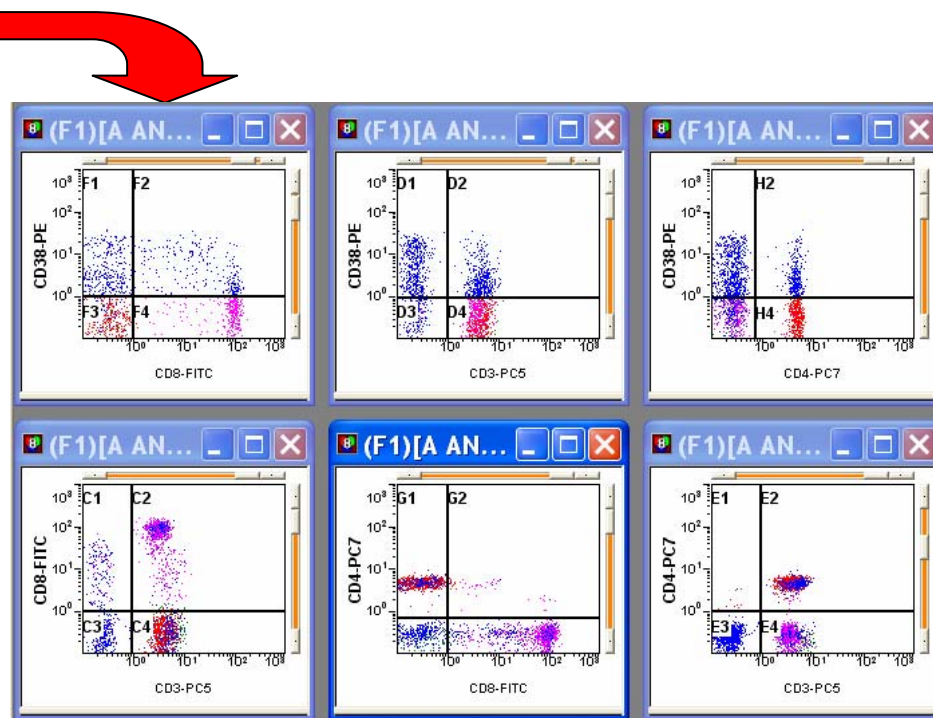
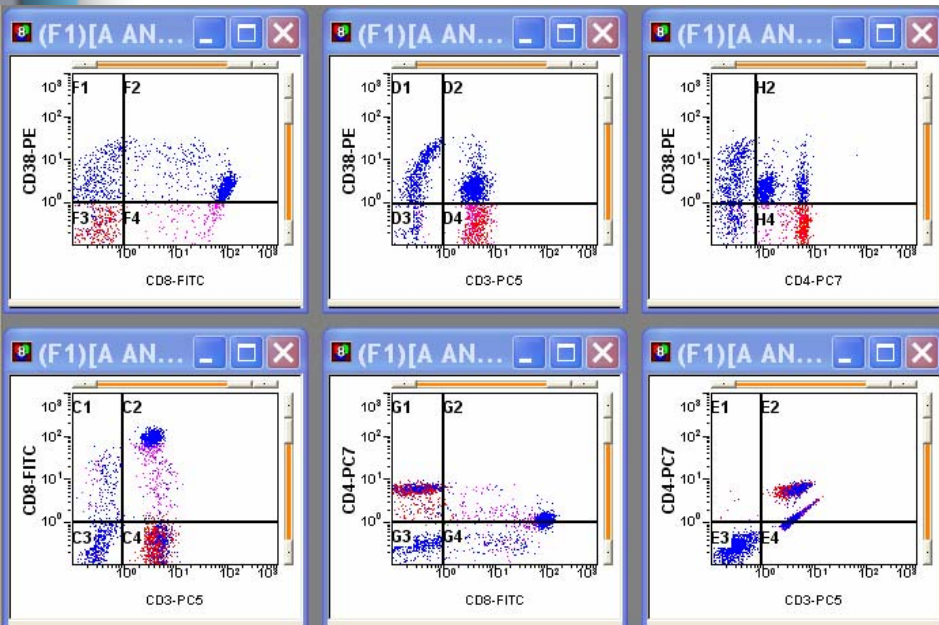
Алгоритм компенсации при многоцветном анализе с использованием CD45 – ручной вариант (шаг 3)

Компенсация всех флуорохромов против CD45 (негативные клетки должны находиться в 1-ой декаде)



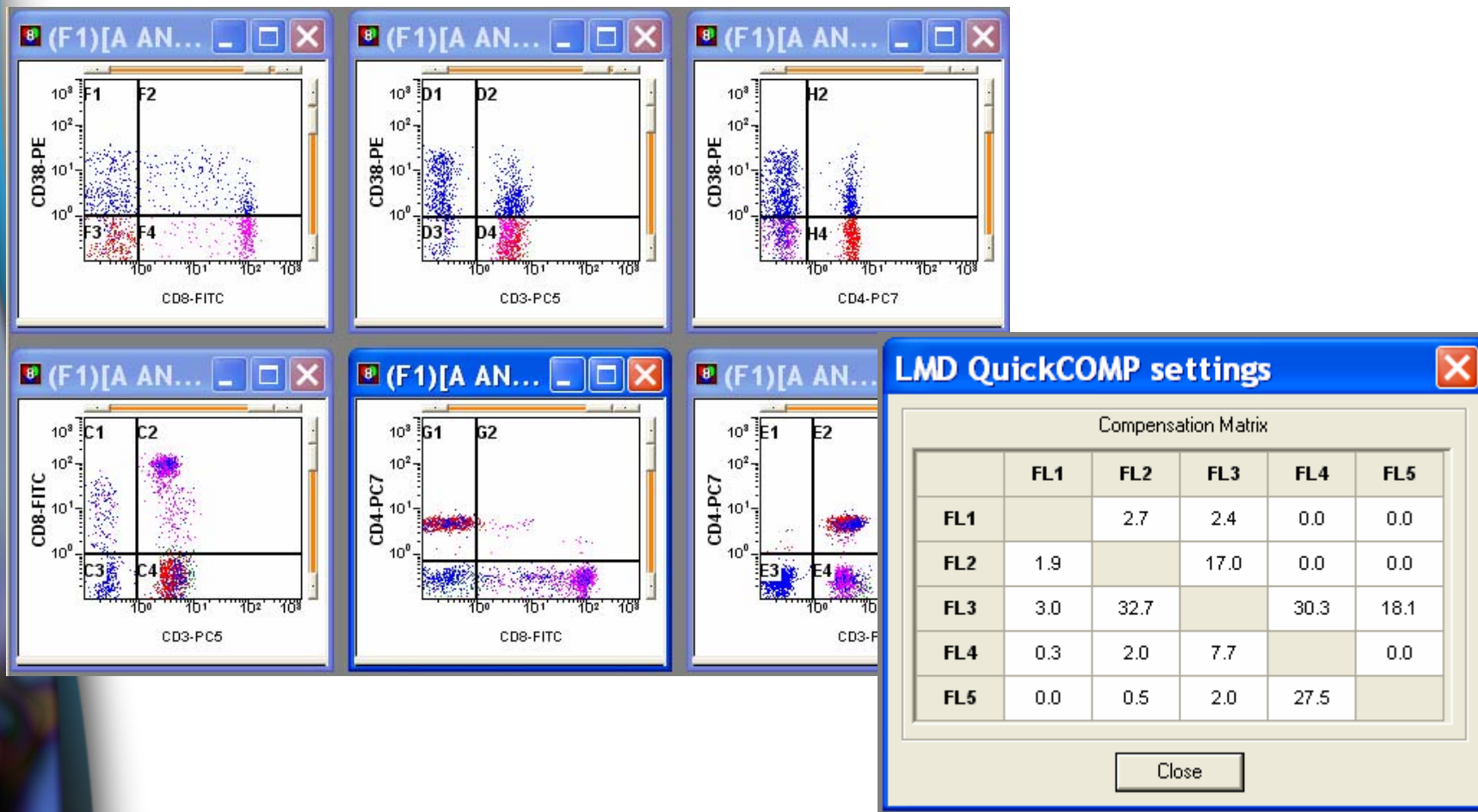
Алгоритм компенсации при многоцветном анализе с использованием CD45 – ручной вариант (шаг 4)

Компенсация всех флуорохромов не связанных с CD45 друг против друга, используя основные правила компенсации.



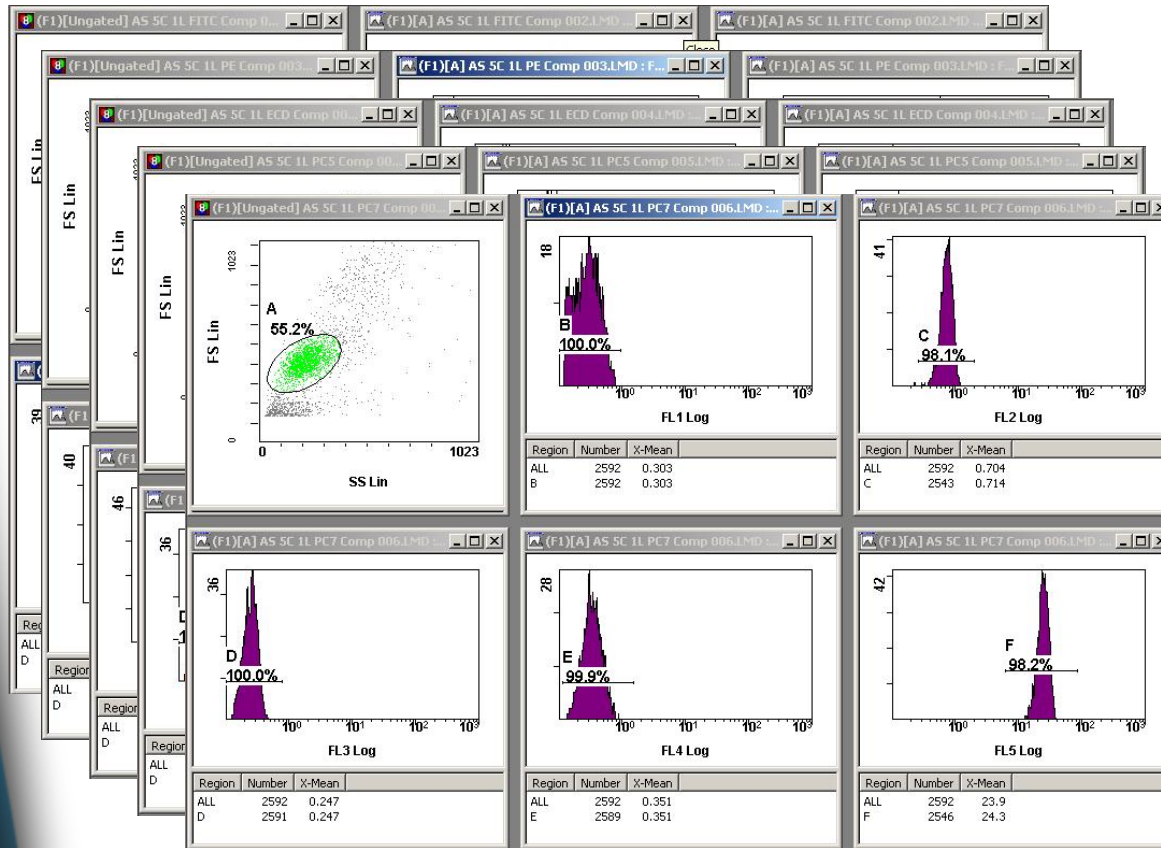
Алгоритм компенсации при многоцветном анализе с использованием CD45 – ручной вариант (шаг 4)

Компенсация всех флуорохромов против всех



Стандартизация и автоматическая компенсация

Клетки Cyto-Trol™



$$FI2 - \Delta FI1 = X$$

$$\frac{3,16}{21,4} \times 100 = 14,76\%$$

LMD QuickCOMP settings

Compensation Matrix

	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5
FL1		1.2	3.3	2.4	1.3
FL2	14.7		14.2	3.5	2.9
FL3	3.6	25.9		2.2	1.0
FL4	1.6	3.7	21.7		1.5
FL5	1.5	1.1	6.1	25.7	

Close

Необходимо для качественного анализа и контроля качества в Проточной Цитометрии.

• 1. Калибровка

- Использование латексных частиц, для проверки оптического выравнивания источника света.**
- Использование латексных частиц, для контроля мощности источника света.**
 - Делается как правило один раз в день или в случаях получения не корректных результатов.**

Калибровка



- ***Flow-Check™ флуоросферы***
 - *Установки инструмента - выравнивание оптической системы*
 - *Референтный материал с приемлемыми значениями для оптического выравнивания.*

Калибровка

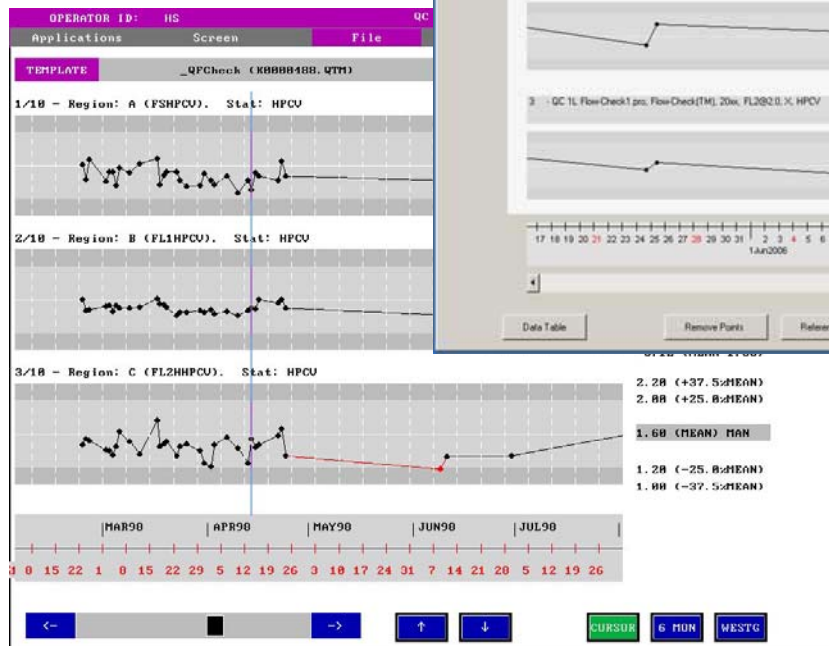
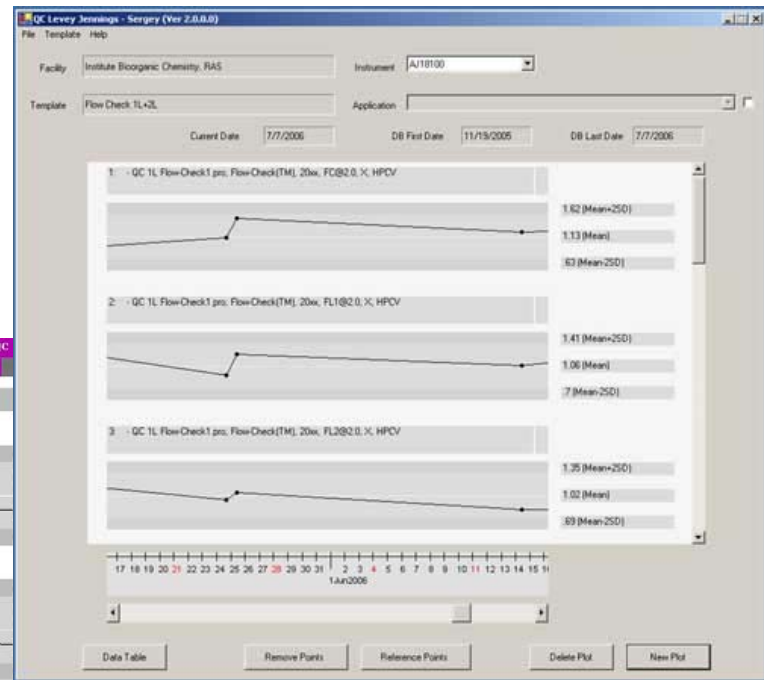


Flow-Check™ – универсальные флуоросферы необходимые для настройки всех проточных цитметров Beckman Coulter

Flow-Check™ флуоросферы для настройки проточного цитметра FC500 с двумя лазерами



Калибровка и приложение QC



Необходимо для качественного анализа и контроля качества в Проточной Цитометрии.

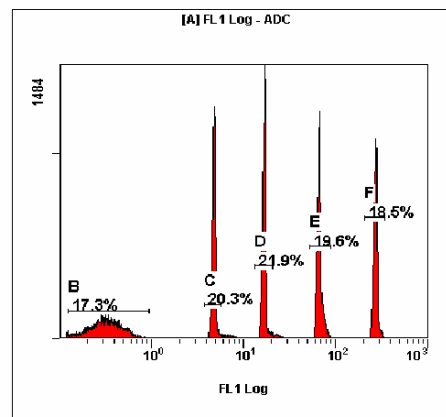
- **2. Стандартизация**
 - **Измерение:**
 - **разрешение**
 - **линейность**
 - **чувствительность**
 - **компенсация**
 - **Делается как правило один раз в день или в случаях получения не корректных результатов.**
 - **Компенсация может быть выполнена однажды перед использованием нового приложения.**

Стандартизация

Immuno-Brite™ флуоросферы

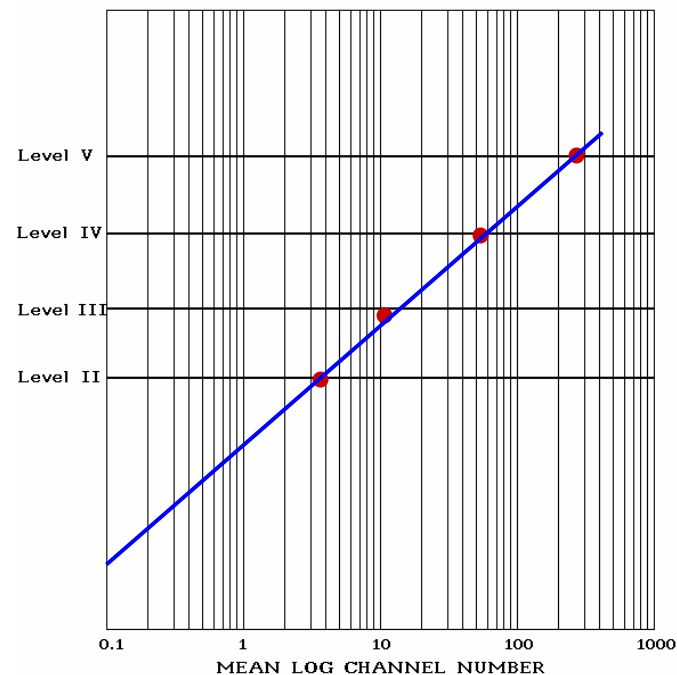
- разрешение
- линейность
- чувствительность

Мониторинг
разрешения флюоресценции -
используется для оценки
чувствительности и
инструмента линейности
анализа



[A] FL1 Log Region	Number	X-Mean
B	11428	0.344
C	13414	4.77
D	14450	16.8
E	12898	67.1
F	12185	271

IMMUNO-BRITE
Log Amplifier Linearity Verification



Стандартизация

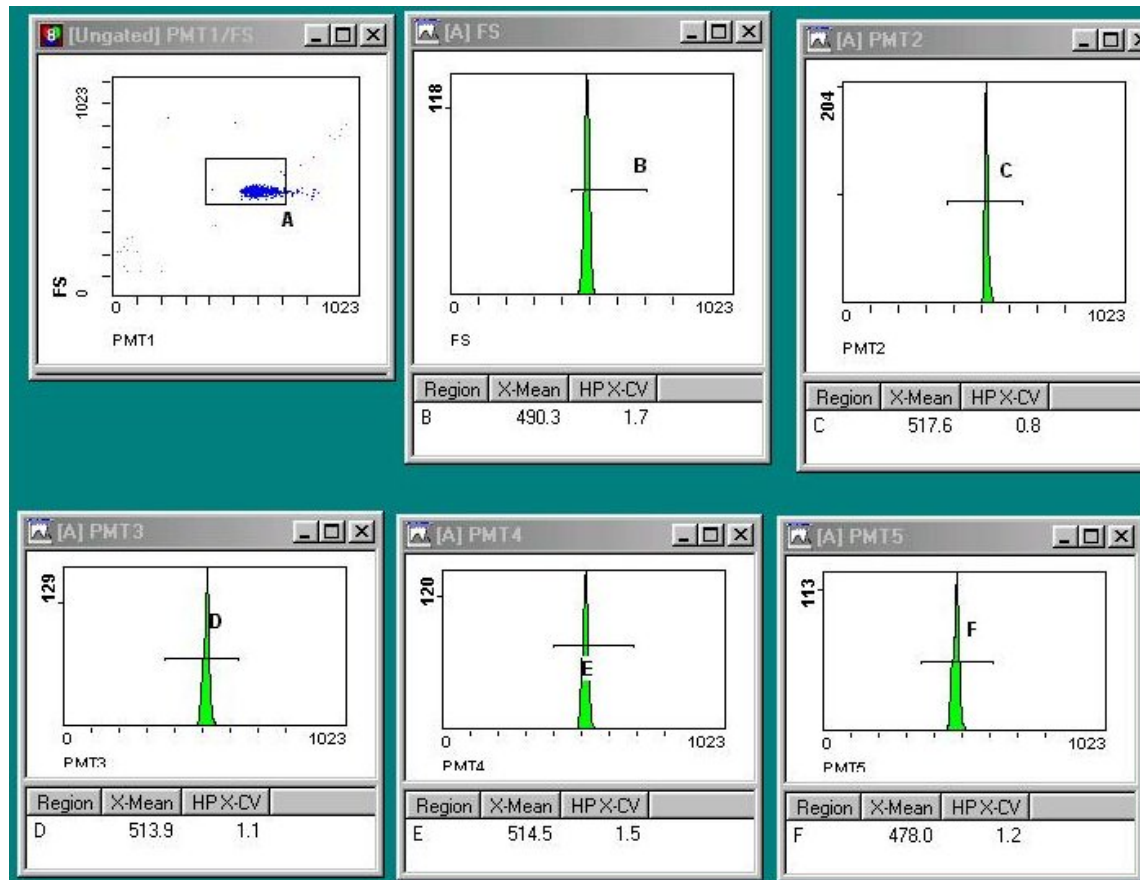
Flow-Set™ флуоросферы

Мониторинг чувствительности при выполнении анализа.

Референт материал с приемлемыми значениями для тест-специфических настроек близких к реальным.

Стандартизация

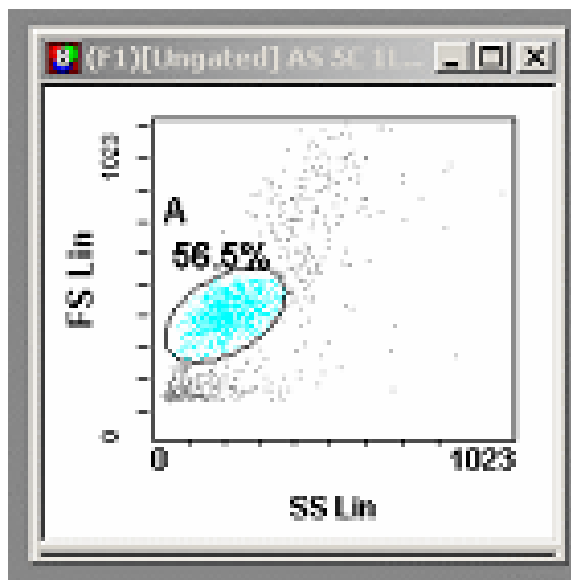
Флуоросферы Flow Set™



Стандартизация



Клетки Cyto-Trol™



Клетки, приготовленные при помощи лиофилизации. После добавления растворителя практически полностью сохраняют характеристики нативных клеток.

Необходимо для качественного анализа и контроля качества в Проточной Цитометрии.

• 3. Контроль

- Контроль образца перед началом работы**
- Изотипический контроль**
- Контроль методологии и процесса анализа**

Как правило выполняется каждый день или при изменениях в работе системы.

Некоторые лаборатории выполняют с каждой партией, до и после нее.

Проверка работы системы.

Клетки IMMUNO-TROL™

IMMUNO-TROL™ Cells - положительный контроль для проточной цитометрии. IMMUNO-TROL™ Cells позволяет проверить наличие определенных антигенов для лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов, а также их абсолютный счет в одноплатформенной системе. Рассеивание света, распределение субпопуляций, интенсивность флюоресценции и плотность антигенов полностью симулирует параметры цельной крови.

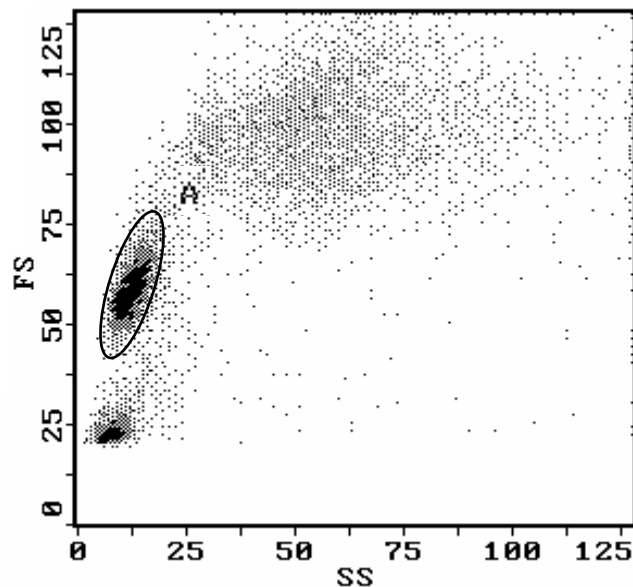
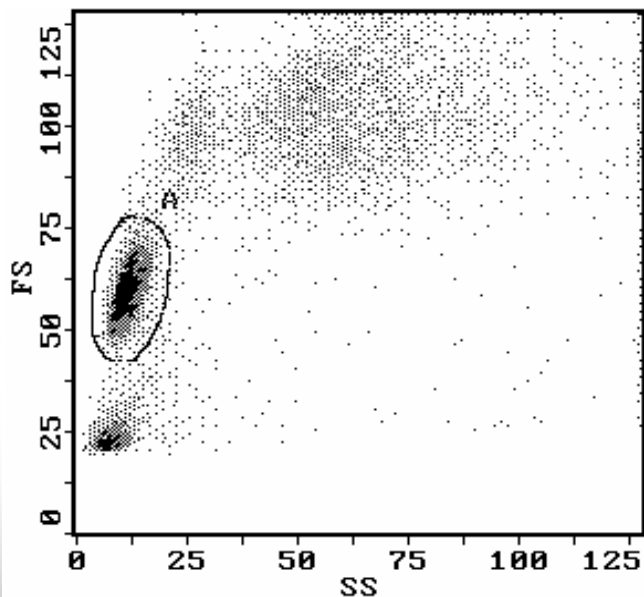
IMMUNO-TROL™ Low Cells обеспечивает то же самое качество и воспроизводимость как IMMUNO-TROL™ Cells за исключением более низкого абсолютного счета для CD4. IMMUNO-TROL™ Low Cells также сохраняет стабильность в течении 90 дней после открытия флаконов, что снижает затраты.

Хайдуков С.В.



Симулирует цельную кровь

Периферическая кровь Клетки IMMUNO-TROL



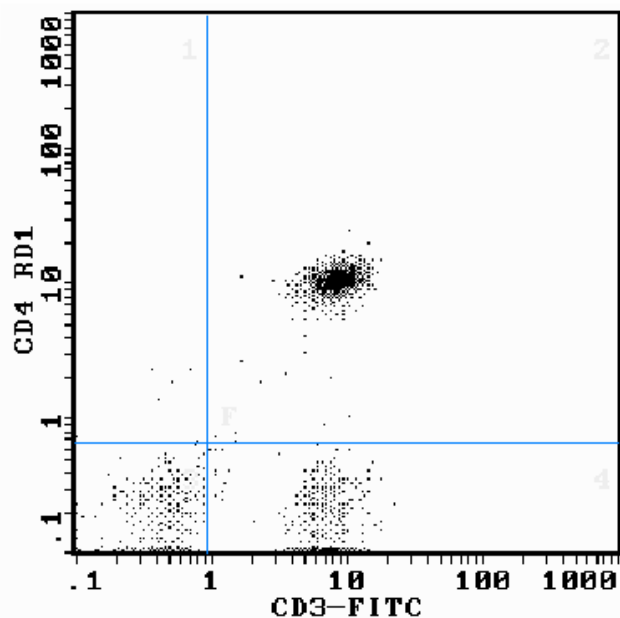
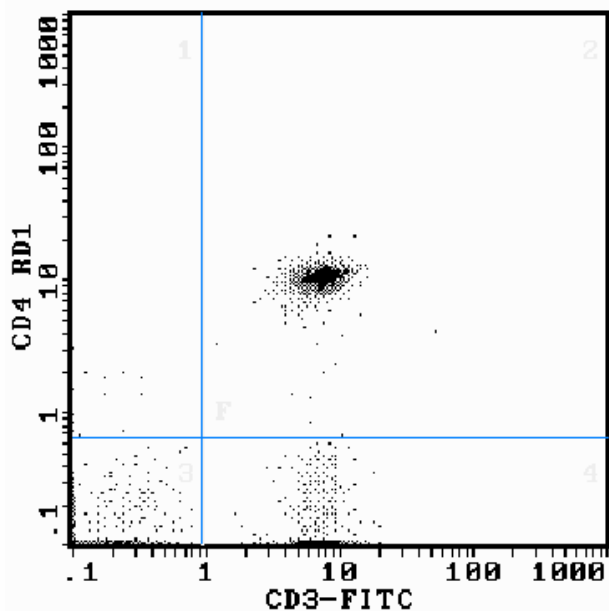
Лизис с ImmunoPrep на TQ-Prep



Симулирует цельную кровь

Периферическая кровь

Клетки IMMUNO-TROL

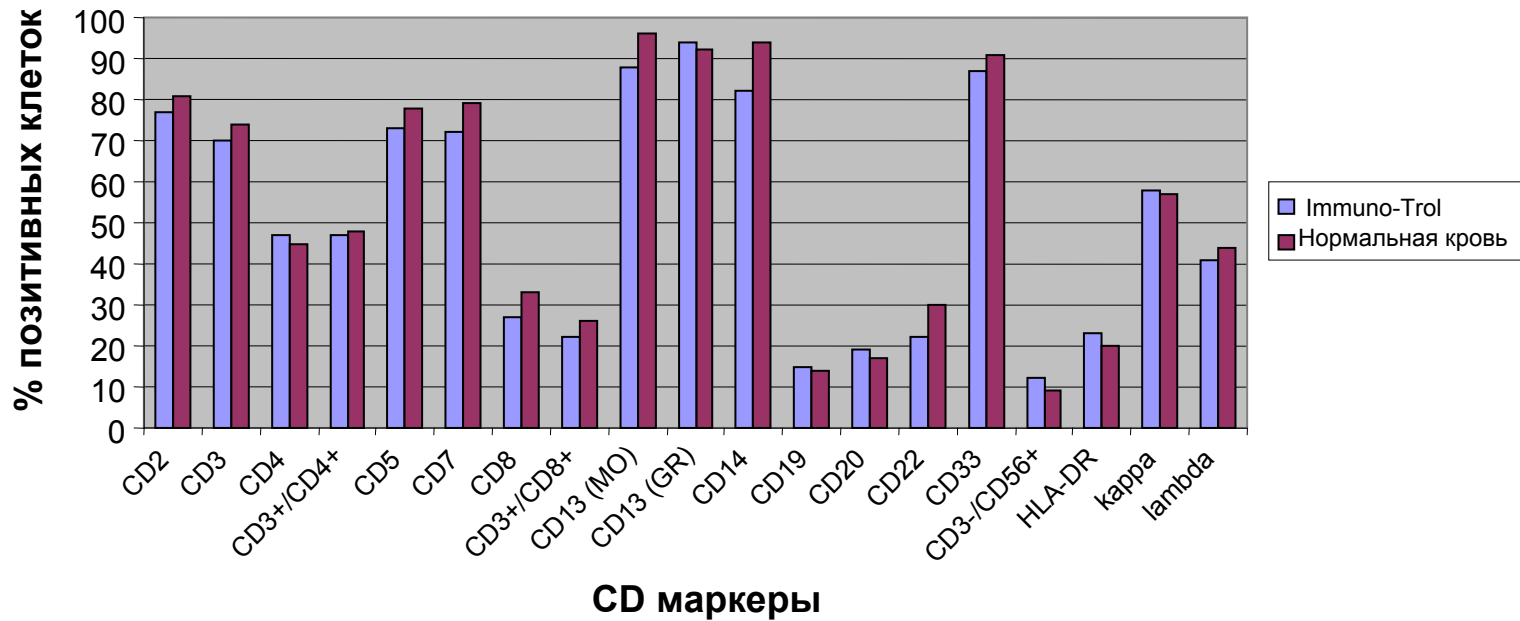


*Антитела Cyto-Stat CD3/CD4,
лизис с ImmunoPrep на TQ-Prep*

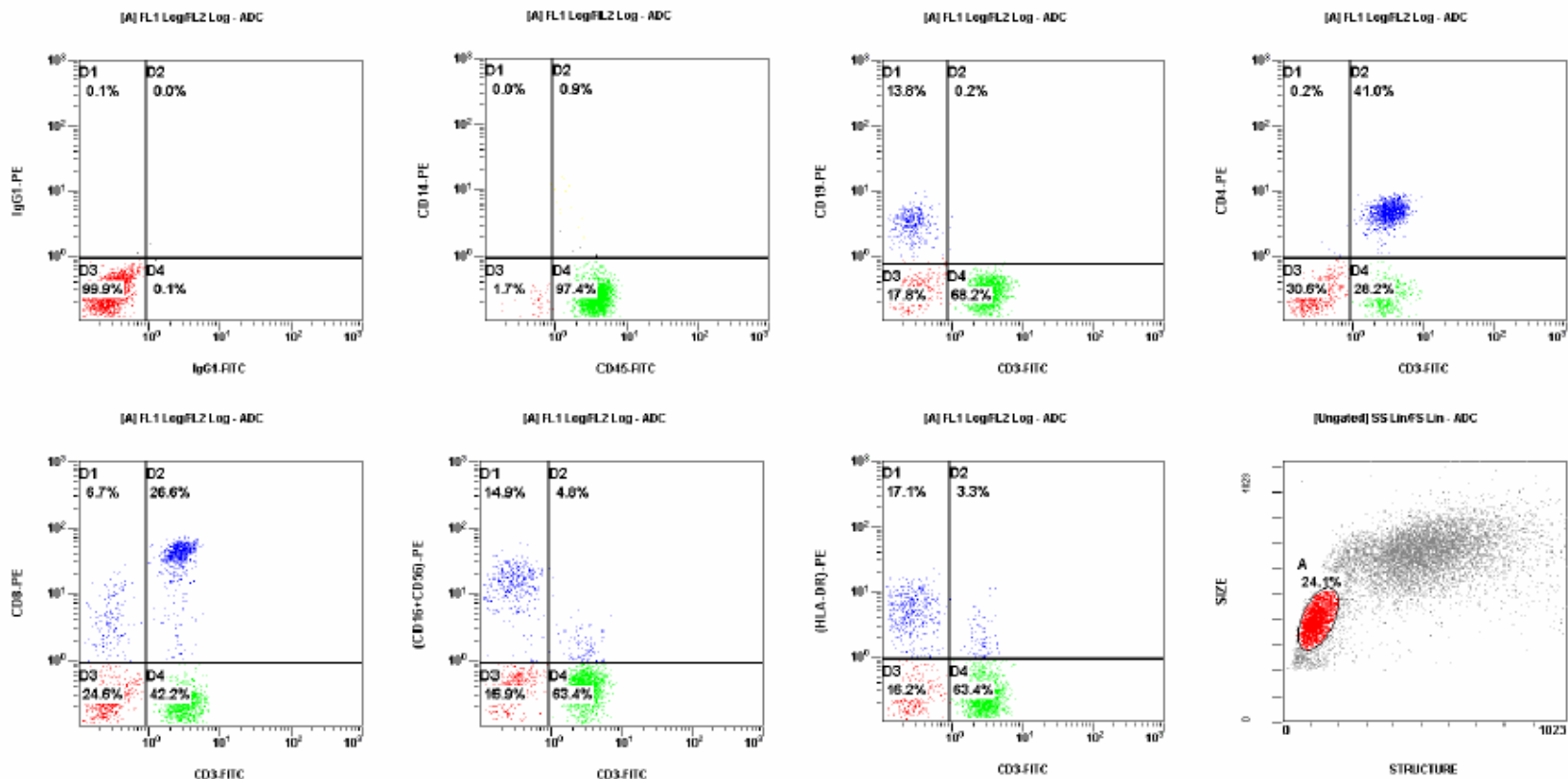
Симулирует цельную кровь



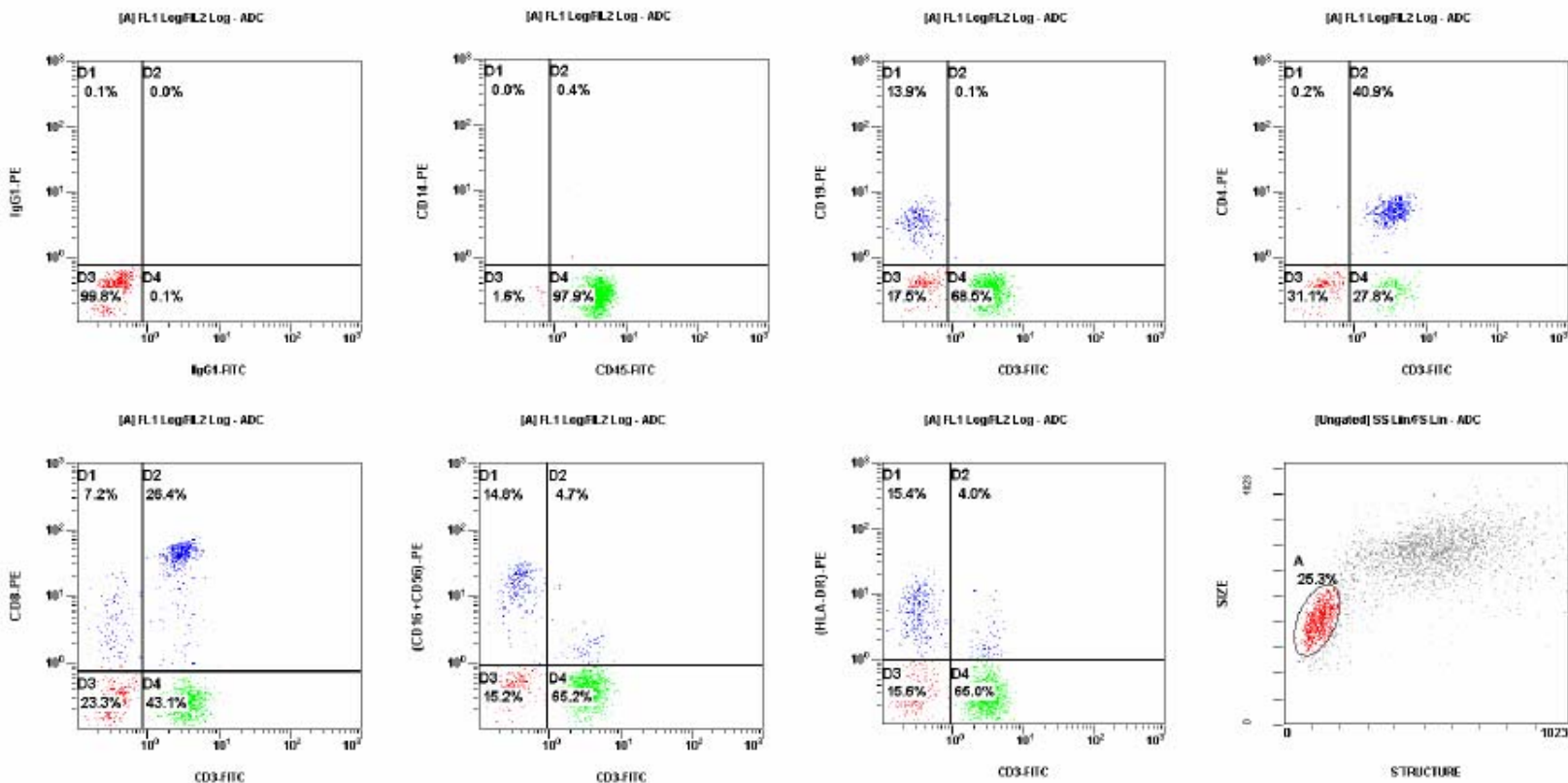
**Сравнение Процентов Положительных Популяций:
Immuno-Trol и нормальная кровь**



Клетки IMMUNO-TROL™ сразу после лизиса



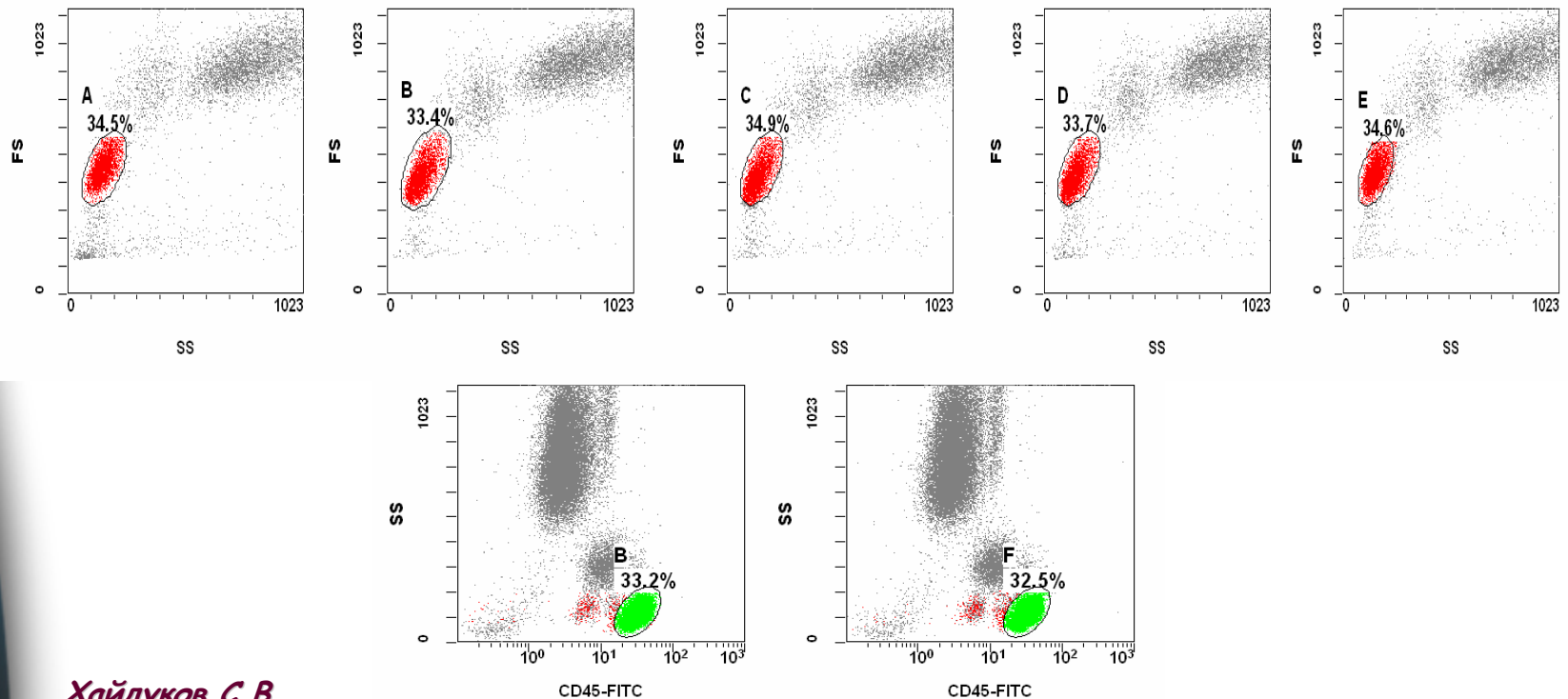
Клетки IMMUNO-TROL™ спустя 24 часа после лизиса



Контроль качества

Цель: высокая чистота и высокая воспроизводимость анализа

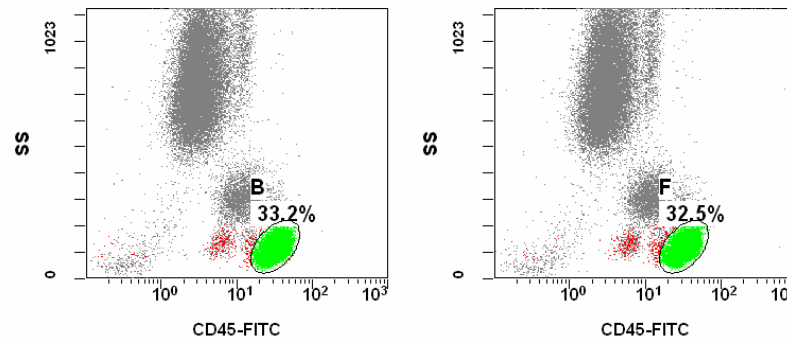
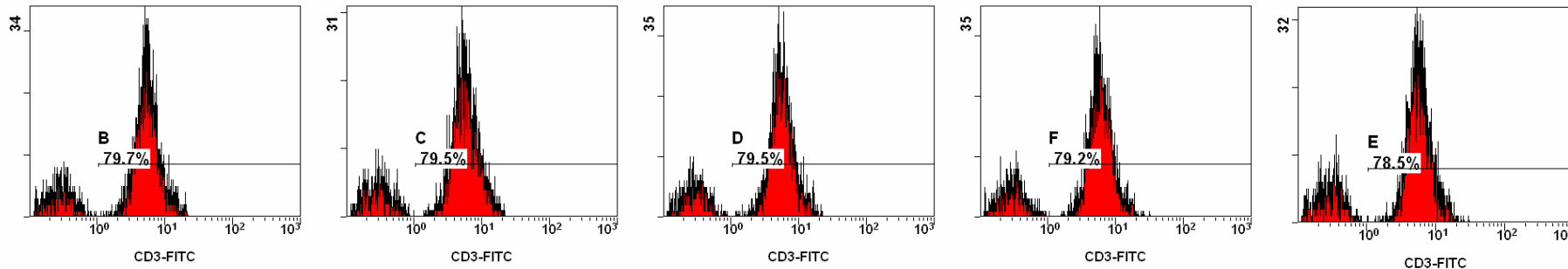
- **Чистота анализа**
 - Количество клеток в гейте, которые являются лимфоцитами либо по морфологическим признакам, либо по CD45. Цель: > 95%



Контроль качества

Цель: высокая чистота и высокая воспроизводимость анализа

- **Воспроизводимость анализа**
 - Процент лимфоцитов в образце, которые попадают в гейт по CD45. Либо по маркеру, который наиболее часто использован в данном анализе, например CD3. Цель: > 95 %



Контроль качества

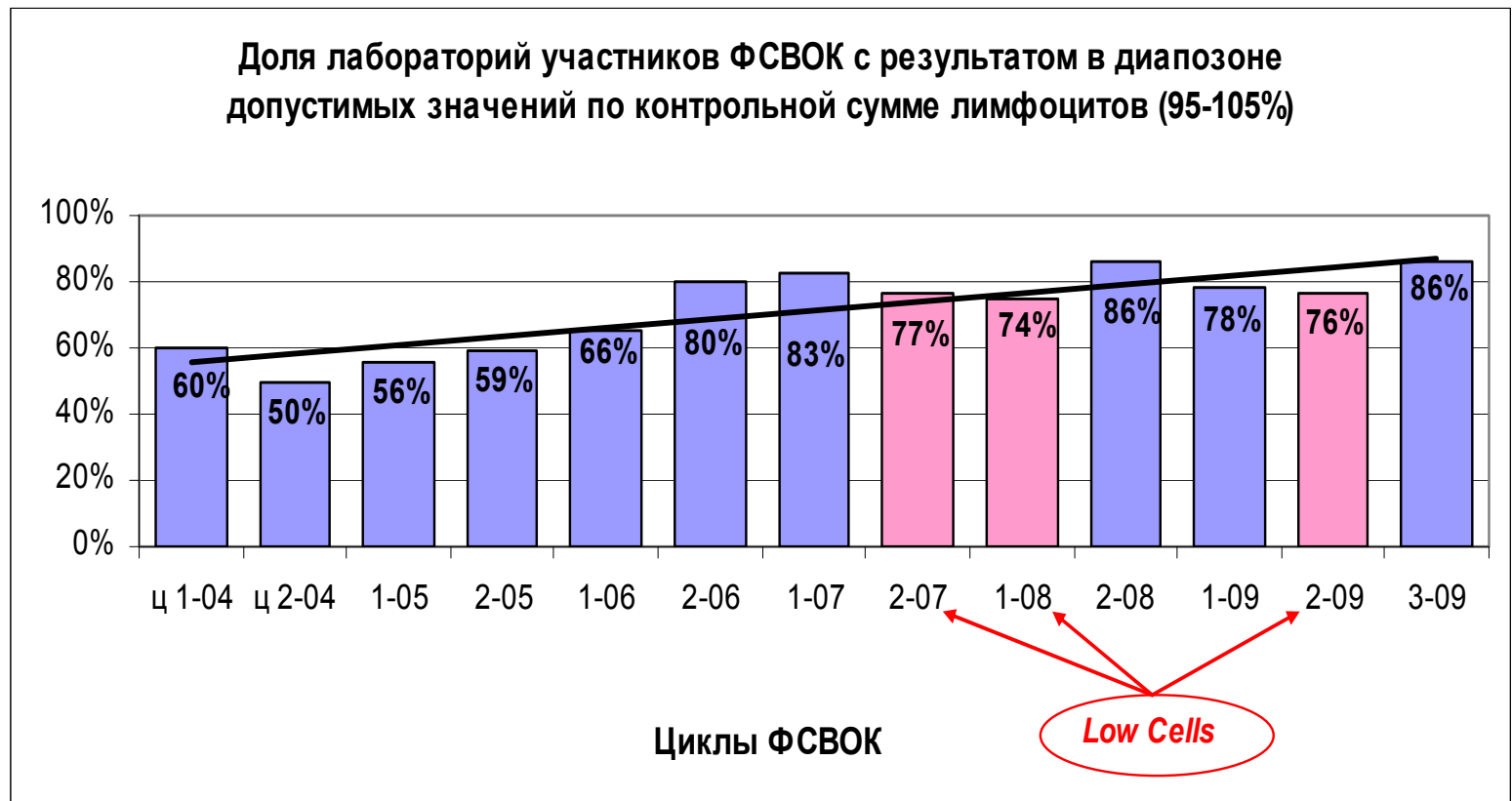
Внутренний контроль качества

- **Внутрилабораторная проверка**
 - **Последовательная проверка**
 - **% CD3⁺ клеток в каждой пробирке +/- 3 %**
 - **Контрольная сумма лимфоцитов**
 - **(% CD3⁺ клеток + % CD19⁺ клеток + % CD3⁻CD16⁺/CD56⁺ клеток) в лимфоцитарном гейте = 100 % (+/- 5%)**
 - **% CD3⁺/CD4⁺ клеток + % CD3⁺/CD8⁺ клеток ≈ % CD3⁺ клеток**

Контроль качества

Внешний контроль качества

Результат оценки качества цитометрических исследований по материалам ФСВОК (2004 – 2009 г.г.)



Контрольная сумма = %Т-клеток + %В-клеток + %NK-клеток $\approx 100 \pm 5 \%$

***СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ***