

ANEXA III. COMPARTIMENTUL DE FLOW-CITOMETRIE

Sectiunea de flow-citometrie va include doua unitati, independente, situate in vecinatate imediata:

1. unitatea de manipulare si prelucrare a probelor. Aceeasi incapere va fi destinata si stocarii de reactivi si consumabile specifice activitatii de flow-citometrie
2. unitatea de achizitie, prelucrare si arhivare a datelor de flow-citometrie si sortare celulara

1. UNITATEA DE MANIPULARE SI PRELUCARE A PROBELOR PENTRU FLOW-CITOMETRIE/ SEPARARE

Aceasta unitate, situata atat in vecinatatea incaperii in care se va face receptia si inregistrarea probelor biologice, cat si a sectiunii de culturi celulare, va avea trei **destinatii** distincte:

a. manipularea lichidelor biologice provenite de la pacienti (sange periferic, aspirat medular, lichid de lavaj bronho-alveolar, lichid pleural, aspirat cu ac fin din ganglioni limfatici, fragmente de tesu/tumori) si a suspensiilor celulare/ supernatantelor provenite din culturi in vederea analizei prin flow-citometrie sau a separarii celulare.

b. stocarea reactivilor, materialelor si consumabilelor necesare analizei prin flow-citometrie sau a separarii celulare, in scopul asigurarii unei accesibilitati directe si eficientizarii acestei etape de lucru.

c. evaluarea, prin microscopie, a suspensiei celulare, pe de o parte pentru aprecierea celularitatii si calitatii sale (viabilitate, gradul de omogenitate), iar pe de alta parte pentru selectarea panelului de reactivi ce urmeaza a fi utilizat, in functie de compozitie.

Materiile prime si materiale necesare in aceasta unitate sunt estimate la valoarea de 23 000 euro pe luna (Este estimat consumul lunar corespunzător tuturor utilizatorilor)

Materii prime (reactivi)			
	Preț/Unitate (EURO)	Cantitate	Preț Total (EURO)
Anticorpi monoclonali marcati fluorescenti necesari imunofenotiparii prin flow-citometrie (marcari de suprafata membranara, marcarea intracelulara)	-	-	8000
Fluorocromi destinati marcarii acizilor nucleici (coloratii vitale, evidentierea fazelor ciclului celular, a procesului de apoptoza, a proceselor de aneuploidie, a raportului AND/ARN, a functionarii pompelor membranare, a populatiei SP-side population)	-	-	1500
Reactivi fluorescenti utili pentru evaluarea proliferarii celulare: CFSE, Brom-deoxi-uridina	-	-	500
Reactivi necesari pentru marcarea celulelor cu microsfera magnetice cuplate cu anticorpi monoclonari, in vederea separarii lor, coloane de separare solutii de spalare, tuburi colectoare	-	-	4000
Truse pentru evaluarea cantitativa, prin flow-citometrie a unor factori solubili in lichide biologice/supernatant de cultura	3000	2	6000
Consumabile			
Solutii izotone de spalare a probelor	-	-	400
Solutie de liza a hematiilor	-	-	350
Solutii de permeabilizare si fixare membranara	-	-	300
Tuburi de 5 ml	-	-	300
Varfuri de pipete	-	-	300
Lame pentru microscopie	-	-	200
Camere pentru numararea celulelor	-	-	100

Coloranti pentru evaluarea morfologica prin microscopie a suspensior celulare	-	-	50
Trusa pentru controlul extern de calitate	1000	1	1000
TOTAL			23000

Echipamente necesare. (Echipamentele notate cu * sunt deja disponibile)

Echipament	Preț/Unitate (EURO)	Cantitate	Preț Total (EURO)
Microscop optic cuplat cu o camera video digitala si sitem computerizat de prelucrare si stocare a imaginilor in vederea competarii bazelor de date+software destinat	20000	1	20000
Fiset multicompartimentat pentru stocarea lamelor microscopice	600	1	600
Roller pentru omogenizarea probelor biologice inaintea prelucrarii lor	500	2	1000
Agitator vortex, pentru omogenizarea probelor biologice inaintea achizitiei datelor	500	1	500
Frigider, 4oC, 240 L	700	1	700
pH-metru*		1	
Centrifugă cu răcire, cu rotor cu patru brate si nacele schimbabile pentru tuburi de calibre variate	5000	1	5000
Centrifuga Hettich pentru efectuarealamelor de citospin*			
Set micropipete automate: <ul style="list-style-type: none"> • 0,1-2,5 µl • 0,5-10 µl • 2-20 µl • 10-100 µl • 20-200 µl • 100-1000 µl • 500-5000 µl 	2000	2	4000

Sticlărie, accesorii de laborator			2000
Mobilier			
Scaun cu inaltime reglabila,	150	4	600
Masa de laborator cu dulapuri incluse sub blat, lungimea de 4 metri, latime de 90 cm; mesele vor fi prevazute cu roti reglabile	400	2	800
Rafturi lungime 4 metri, latime 40 cm, inaltime 2 metri	500	2	1000
TOTAL			41200

2. UNITATEA DE ACHIZITIE, PRELUCRARE SI ARHIVARE A DATELOR DE FLOW-CITOMETRIE/ SORTARE CELULARA

Sectiunea aceasta are trei **destinatii** distincte:

- a. achizitia datelor de flow-citometrie** prin utilizarea celor doua citometre (unul deja existent, cu doua lasere, capabil sa detecteze concomitent sase parametri, dintre care 4 culori).
- b. prelucrarea si arhivarea datelor** post-achizitie
- c. separarea magnetica**, automatizata, a celulelor

Materiile prime si materiale necesare in aceasta unitate sunt estimate la valoarea de 2600 euro pe luna (Este estimat consumul lunar corespunzător tuturor utilizatorilor)

Materii prime (reactivi)			
	Preț/Unitate (EURO)	Cantitate	Preț Total (EURO)
Solutii izotone de rulara probelor	100	10	1000
Solutii de decontaminare si intretinere specifice aparatelor de flow-citometrie	50	1	50
Truse necesare controlului zilnic ai parametrilor aparatelor de flow-citometrie	550	1	550
Truse pentru intretinerea aparatelor de flow-citometrie	500	1	500

Dispozitive de stocare/arhivare a datelor achizitionate (stickuri de memorie, CD-uri, dosare)	-	-	500
TOTAL			2600

Echipamente necesare. (Echipamentele notate cu * sunt deja disponibile)

Echipament	Preț/Unitate (EURO)	Cantitate	Preț Total (EURO)
Flow-citometru FACS-calibur, 2 lasere, 4 clori*		1	
Flow-citometru cu trei lasere (488, 633, 405 nm), 8 culori	300000	1	300000
Software PC-compatibil pentru prelucrarea post-achizitie a datelor de flow-citometrie	2500	1	2500
Separator magnetic automat (pentru protocoale de imbogatire simpla si dubla, selectie pozitiva si negativa concomitenta, cu o capacitate de separare de 4x10 ⁹ /proba/coloana)	30000	1	30000
Computer pentru prelucrarea datelor de flow-citometrie post-achizitie, licenta software	5000	1	5000
Computer pentru alcatuirea bazelor de date si arhivare, licenta software	5000	1	5000
Frigider, 4oC, 120L	250	1	250
Agitator vortex, pentru omogenizarea probelor biologice inaintea achizitiei datelor	500	3	1500
Set micropipete automate: <ul style="list-style-type: none"> • 0,1-2,5 µl • 0,5-10 µl • 2-20 µl • 10-100 µl • 20-200 µl • 100-1000 µl • 500-5000 µl 	2000	1	2000

Mobilier			
Scaun cu inaltime reglabila,	150	8	1200
Masa de laborator cu dulapuri incluse sub blat, lungimea de 4 metri, latime de 90 cm, mesele vor fi prevazute cu roti reglabile	400	3	1200
Rafturi lungime 4 metri, latime 40 cm, inaltime 2 metri	500	3	1000
TOTAL			349650

Necesarul de personal

Pentru activitatile desfasurate in compartimentele sectiunii de flow-citometrie sint necesare 2 tipuri de personal. **Personal specializat:** va fi necesara crearea unui post de biolog/ medic de laboator care sa se ocupe cu ameliorarea si optimizarea etapelor de lucru, consultanta tehnica pentru ceilalti utilizatori, executarea controalelor de calitate, intern si extern, gestionarea bazelor de date, instruirea utilizatorilor noi, asigurarea unui flux constant al reactivilor si consumabilelor. De asemenea, in aceasta unitate este necesara prezenta unui responsabil cu functionarea intregii unitati de flow-citometrie si intretinerea aparaturii. Noțiunea de „responsabil” este referitoare la o persoană din laborator care, pe lângă activitatea zilnică permanentă, este responsabilă și de activitățile /sarcinile aferente domeniului restrâns precizat. **Personalul de lucru:** va fi reprezentat de doctoranzi, studenti masteranzi, sau investigatori cuprinsi in aceste activitatii in maniera grant-dependenta. Data fiind eficientizarea spatiala a unitatii, prin proiectarea unui flux tehnologic etapizat, cu separarea spatiilor de lucru in functie de activitate (prelucrare probe, evaluare calitate probe, marcare, achizitie flow-citometrica/ separare celulara, analiza date flow-citometrie, prelucrare date, arhivare), aceasta sectiune este **accesibila simultan** pentru 6 grupuri de investigatori (doua persoane pe grup), doua grupuri in unitatea 1., de manipulare si prelucrare a probelor, patru in unitatea 2., de achizitie, prelucrare si arhivare a datelor de flow-citometrie.

Schema fluxurilor tehnologice

Prin gama variata de aplicatii pe care aceasta tehnica o ofera, sectiunea de flow-citometrie este indispensabila proiectelor de cercetare cu grad inalt de interdisciplinaritate. Acest sector permite evaluarea imunofenotipica a diverselor categorii celulare, detectia intracelulara de factori, metaboliti, evidentierea

fazelor ciclului celular, procesului de apoptoza, viabilitatii celulare, aneuploidiei, raportului AND/ARN, functionarii pompelor membranare, populatiei SP (side population, corespondentul functional al celulelor stem), proliferarii celulare sau compozitiei complexe citokinice a produselor biologice sau a supernatantelor de cultura. Analiza multiparametrica permite identificarea unor entitati celulare particulare a caror relevanta diagnostica sau post-terapeutica poate fi evaluata pe loturi extinse de pacienti, in dinamica, pe parcursul evolutiei bolii sau in sisteme standardizate *in vitro* care reflecta interactiunile celulare particulare micromediilor tumorale *in vivo*.

Asigurarea unei functionari optime a sectiunii de flow-citometrie impune partajarea sa in doua unitati distincte, care permit o activitate etapizata: **1.** unitatea de manipulare si prelucrare a probelor (in scopul eficientizarii lucrului, aceeasi incapere va fi destinata si stocarii de reactivi si consumabile specifice activitatii de flow-citometrie/ sortari celulare); **2.** unitatea de achizitie, prelucrare si arhivare a datelor de flow-citometrie. Amplasamentul acestei sectiuni a fost gandit la distante echivalente fata de unitatea de receptie a probelor biologice, pe de o parte si fata de sectiunea de culturi celulare, pe de alta parte.

1. Probele biologice (sange periferic, aspirat medular, lichid de lavaj bronho-alveolar, lichid pleural, aspirat cu ac fin din ganglioni limfatici, fragmente de tesut/tumori) sau suspensiile celulare din culturi sunt aduse in **unitatea de prelucrare probe**, unde se face initial o evaluare a calitatii (viabilitate), si compozitiei (efectuarea de lame/ citospin/ coloratii specifice si evaluare microscopica). Pe baza acestei evaluari, precum si a specificului proiectului in desfasurare, se stabileste panelul de markeri care va fi utilizat. Procesarea probelor/ suspensiilor celulare in vederea marcarii cu anticorpi/ fluorocromi specifici implica etape de incubare, spalare, centrifugare, permeabilizare si fixare membranara. In functie de tipul de marcare, este posibil ca, la sfarsitul prelucrarii, sa fie necesara o etapa additionala de evaluare a calitatii suspensiei celulare obtinute. Prelucrarea suspensiilor celulare presupune mentinerea unei temperaturi ambientale constante, de circa 19-20oC asigurata prin sistemul de climatizare. Aceasta unitate este accesibila concomitent pentru doua grupuri distincte (doua persoane/ grup), care pot utiliza alternativ centrifuga cu sistem de racire si spatiul de marcare, pe de o parte si microscopul si spatiul de efectuarea a lamelor, pe de alta parte. In vederea stocarii reactivilor si materialelor va fi necesar un frigider de 240 L, iar pentru stocarea la temperatura camerei este necesara proiectarea pe cei doi pereti longitudinali ai incaperii (fiecare de 4 metri) a unor rafturi speciale, dispuse la 80 cm deasupra meselor cu aparatura specifica. Rafturile se vor dispune pana in tavan si vor avea 60 cm latime si o distanta de 50 cm intre doua rafturi succesive. In scopul colorarii lamelor este necesara prezenta unei chiuvete. Stocarea lamelor se va face intr-un fiset special (Slide Storage Cabinet). Echipamentele destinate acestei unitati vor fi plasate pe mese de lucru speciale prevazute cu roti reglabile, cu posibilitate de fixare.

2. Suspensiile celulare sunt apoi transferate in **unitatea de achizitie, prelucrare si arhivare a datelor de flow-citometrie/ sortare celulara** unde va avea loc analiza flow-citometrica propriu-zisa sau sortarea celulara sau ambele, in functie de specificul proiectului in derulare. Functionarea optima a citometrelor presupune mentinerea unei temperaturi ambientale constante, de circa 19-20oC asigurata prin sistemul de climatizare. Intretinerea zilnica a aparatelor, atat la punerea in functiune, cat si la incheierea programului de lucru, asistenta utilizatorilor in cazul intampinarii unor probleme tehnice, asigurarea calibrarilor zilnice si a controalelor de calitate intern si extern necesita prezenta unei persoane specializate a carei prezenta constanta in aceasta unitate este indispensabila. Consumabilele necesare intretinerii zilnice a aparatului si controalelor de calitate vor fi stocate in aceeasi incapere, fie la 4oC, intr-un frigider de 120L, fie pe rafturi suspendate la 100 cm deasupra meselor pe care se gaseste aparatura. Imediat dupa achizitie, utilizatorul isi transfera datele intr-un computer destinat doar analizei datelor. Arhivarea si crearea bazelor de date se realizeaza intr-un alt computer, asigurandu-se in acest fel eficientizarea la maxim a spatiului, cu posibilitatea utilizarii concomitente a acestei unitati de catre patru grupuri distincte (doua persoane/grup). Va fi necesara achizitionarea unui program de analiza flow-citometrica, PC- compatibila. In aceeasi incapere se vor realiza si separarile magnetice, automatizate, de celule. Suspensiile celulare astfel separate vor fi ulterior reincluse in 1. Unitatea de manipulare si prelucrare a probelor, in vederea marcarii pentru aprecierea puritatii, celularitatii si viabilitatii lor, urmand sa se re-intoarca in Unitatea de achizitie, prelucrare si arhivare a datelor de flow-citometrie, pentru analiza flow-citometrica de control. Separatorul automat destinat efectuarii acestei operatii va permite, pe de o parte separarea concomitenta a fractiunilor negative si pozitive, iar pe de alta parte, recuperarea unor suspensii celulare sterile, ce pot fi ulterior (re)cultivate. Accesul atat spre camera de prelucrarea probelor, cat si spre camera de culturi este rapid. In functie de specificul proiectelor in desfasurare, unele suspensii celulare vor fi crioprezervate.

Descrierea tehnologiei si produse finale

-analiza imunofenotipica multiparametrica permite descrierea unor entitati celulare disincte fenotipic cu relevanta diagnostica

-analiza in dinamica a procelor de apoptoza, proliferare celulara, ciclu celular etc. fie in sisteme in vitro, fie secvential, in specimene biologice de la pacienti, pe parcursul evolutiei bolii, permite elaborarea unor noi criterii prognostice, a unor scheme personalizate de tratament si a evaluarii terapeutice

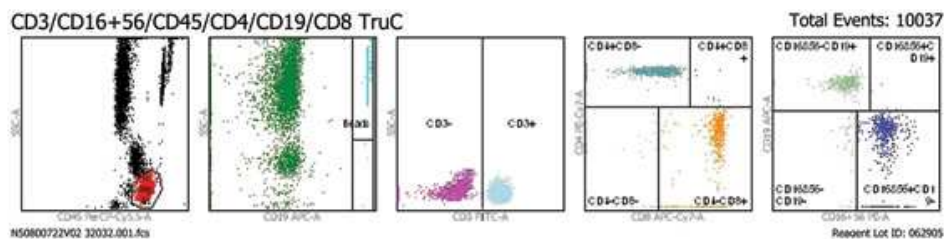
Consumurile specifice si fisele tehnice asociate functionarii acestei sectiuni se incadreaza global intr-o cifra de consum lunar de aproximativ 25 600 euro (anticorpi monoclonali marcati fluorescent, truse pentru

separare magnetica, consumabile pentru intretinerea aparaturii si controalele de calitate, lame pentru microscopie, plasticuri dispozabile etc)

Exemple de activitate în cadrul compartimentului de genomicsă funcțională :



Citometrul Becton Dickinson FACS Canto II cu 3 lasere, folosit pentru analiza multiparametrică (8 culori) a celulelor de interes



Parameter	Percent	Value/AbsCnt
Lymph Events		3841
Bead Events		1834
CD3+	72.46	1515.78
CD3+CD8+	24.84	519.60
CD3+CD4+	44.78	936.81
CD3+CD4+CD8+	0.23	4.90
CD16+CD56+	16.66	348.58
CD19+	9.82	205.34
CD45+		2092.03
4/8 Ratio		1.80

QC Messages
 % T-Sum is: 2.84
 Lymphosum is: 98.93
 4/8 ratio is: 1.80

Exemplu de diagramă de tip Dot Plot obținută folosind Citometrul Becton Dickinson FACS Canto II