

Κυτταρομετρία ποσοτικού φθορισμού

Κατερίνα Ψαρρά

Τμήμα Ανοσολογίας Ιστοσυμβατότητας

Γ.Ν.Α. «Ο Ευαγγελισμός»

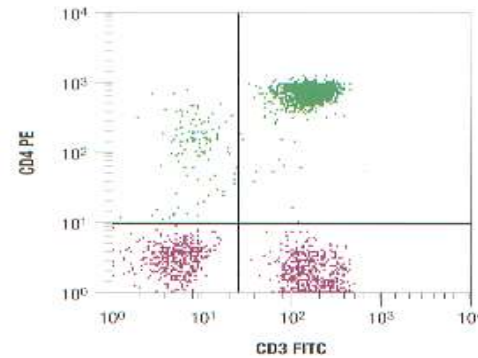
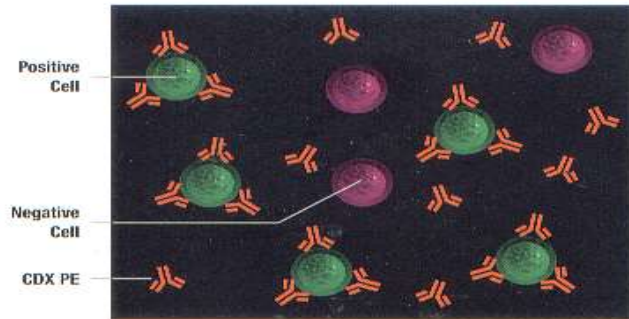
QFCM

Quantitative fluorescence cytometry

Κυτταρομετρία ποσοτικού φθορισμού
ή

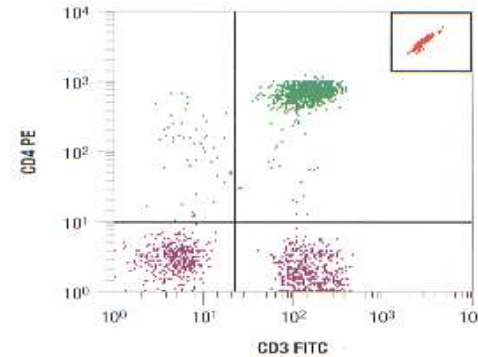
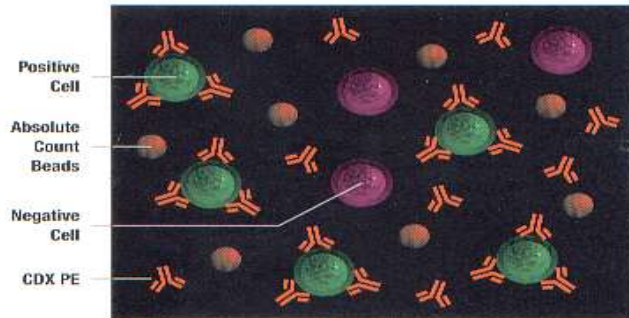
Ποσοτική Κυτταρομετρία Ροής
(Μ: παράγοντας Μέτρηση στην
ΚυτταροΜετρία)

Traditional Analysis — Percent Positives



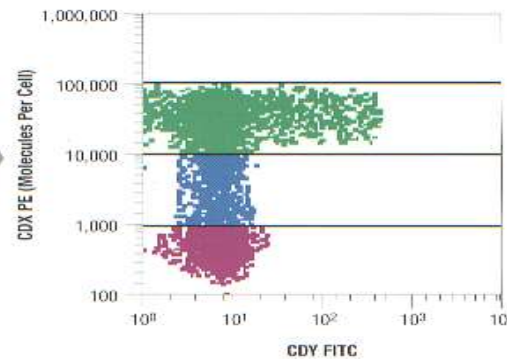
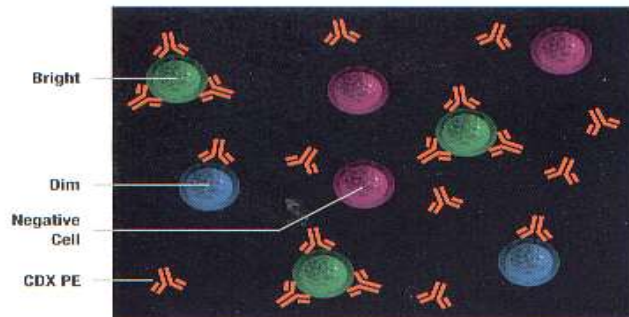
% θετικά

Absolute Counts — Cells per μ L



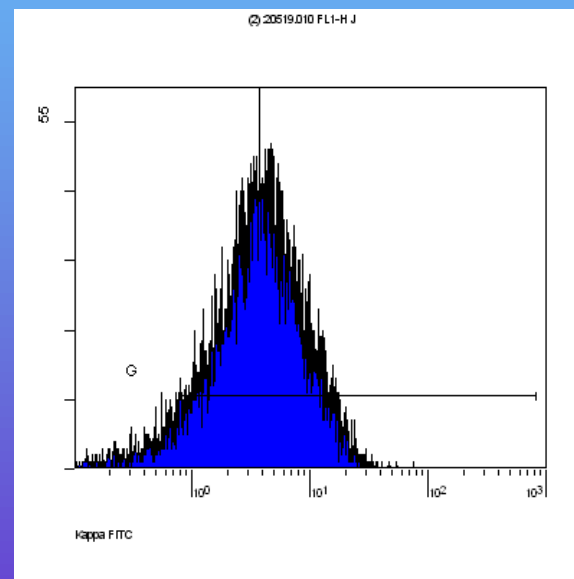
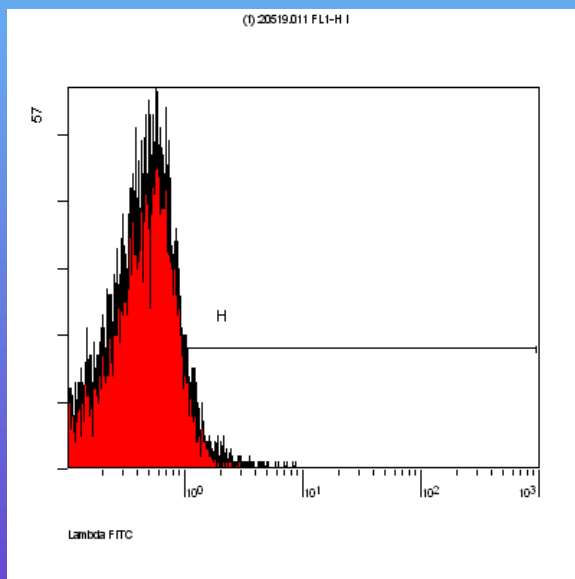
Απόλυτος αριθμός

Quantitation — The number of cells that express antigen above or below a threshold of antibodies bound per cell



Κυτταρομετρία ποσοτικού φθορισμού

Διάκριση θετικού αρνητικού



QFCM - ορισμός

- ♦ Η βαθμονομημένη μέτρηση της έντασης του φθορισμού μέσω **σημασμένων σωματιδίων** (κυττάρων ή μικροσφαιριδίων) με σκοπό να προσδιορισθεί ο πραγματικός αριθμός **φθοριζόντων συνδετών** (φθοριζουσών ουσιών ή μορίων πρωτεϊνών – φθοριζουσών ουσιών), που συνδέονται με κάθε κύτταρο.

QFCM – Πρακτική θεωρία - προαπαιτούμενα

- ◆ Συμπεριφορά λογαριθμικής ενίσχυσης
- ◆ Αρχές ηλεκτρονικής απόσβεσης (compensation)
- ◆ Λειτουργική γνώση μονάδων φθορισμού
- ◆ Κατανόηση χρήσης κλιμάκων
- ◆ Καμπύλες βαθμονόμησης
- ◆ Εκτίμηση τυποποιημένων γραφικών παραστάσεων
- ◆ (σωστή χρήση κλιμάκων αναφοράς)
- ◆ (σωστή χρήση βιολογικών δειγμάτων αναφοράς)

Σχετική ένταση φθορισμού (Relative fluorescence intensity -**RFI**)

- ♦ Αυθαίρετη τιμή → ένταση φθορισμού δείγματος (FI) σε σχέση με άλλες μετρήσεις FI υπό ταυτόσημες συνθήκες.
- ♦ Τιμές RFI : αυθαίρετες μονάδες
1-10000 Becton Dickinson
0.1-1000 Beckman-Coulter

Μόρια ισοδύναμης διαλυτής φθορίζουσας ουσίας

(Molecules of equivalent soluble fluorochrome)

MESF

- ◆ Στοιχειομετρικές μονάδες της έντασης φθορισμού σωματιδίων συνδεδεμένων με φθορίζουσα ουσία
- ◆ Εκφράζονται ως ο αριθμός μορίων της φθορίζουσας ουσίας σε διάλυμα, που απαιτείται για να παράγει την ίδια ένταση φθορισμού με αυτήν του σημασμένου σωματιδίου
- ◆ (απόλυτη μέτρηση που ισχύει για οποιοδήποτε άλλο σωματίδιο σημασμένο με την ίδια φθορίζουσα ουσία σε ίδιες συνθήκες ανάλυσης)

Ικανότητα δέσμευσης αντισώματος (Antibody Binding Capacity) **ABC**

- ♦ Αριθμός μορίων αντισώματος συνδεδεμένων από ένα σωματίδιο σε κορεσμό των θέσεων σύνδεσης
- ♦ AB/C : antibodies bound per cell (δεν απαιτούνται συνθήκες κορεσμού)
- ♦ (απόλυτη μέτρηση, που εξαρτάται όμως από τη χημεία σύνδεσης μεταξύ σωματιδίων (callibrators) και φοριζόντων αντιδραστηρίων)

Βαθμονομημένα σωματίδια αναφοράς (calibrators)

- ◆ Σχετικοί calibrators (μονάδες **RFI** or **RFU**)
 - σχετική τιμή έντασης φθορισμού
- ◆ Απόλυτοι calibrators άμεσα συνδεδεμένοι με φθορίζουσες ουσίες (μονάδες **MESF**)
- ◆ Απόλυτοι calibrators, που συνδέουν τα ίδια συζεύγματα αντισώματος— φθορίζουσας ουσίας προς χρήση με τα κύτταρα (μονάδες **ABC**)

Παραδείγματα calibrators στην αγορά I

- ♦ **Quantibrite** – σφαιρίδια συνδεδεμένα με γνωστές ποσότητες μορίων PE — τα κύτταρα σημαίνονται με κατάλληλα MoAb-PE (F/P=1/1)
- ♦ **Quantum Simple Cellular** - σφαιρίδια συνδεδεμένα με γνωστές ποσότητες μορίων Ig anti-mouse – αντίδραση με MoAb συνδεδεμένο με φθορίζουσα ουσία (άμεσος ανοσοφθορισμός)
- ♦ **QIFI** – σφαιρίδια συνδεδεμένα με γνωστές ποσότητες MoAb – αντίδραση με Ig anti-mouse συνδεδεμένη με φθορίζουσα ουσία (έμμεσος ανοσοφθορισμός)

Παραδείγματα calibrators στην αγορά II

- ♦ Quantum – MESF FITC ή PE – πολλαπλά μικροσφαιρίδια συνδεδεμένα με μόρια με τιμές ισοδύναμης φθορίζουσας ουσίας (MESF) που προσδιορίσθηκαν σε σύγκριση με αντίστοιχα διαλύματα διαλυτής φθορίζουσας ουσίας

CLASSIFICATION SYSTEM OF FLUORESCENCE STANDARDS

*Applicability of Various Types of Standards for Instrument Set-Up and Calibration**

Function	Types of standards (see Table 1 for explanation)								
	0	Ia	Ib	IIA	IIB	IIC	IIIA	IIIB	IIIC
Instrument set-up									
Alignment	—	+	+	±	—	—	±	—	—
Positioning of FL window									
of analysis	±	—	—	+ ^a	+	±	+ ^a	+	± ³
Color compensation	—	—	—	—	±	+	—	±	+
Instrument calibration									
Linearity	—	—	—	—	—	—	+	+	+
Noise level	+ ^b	—	—	—	—	—	—	—	—
Dynamic range	—	—	—	—	—	—	+	+	+
Zero channel value	—	—	—	—	—	—	± ^a	+	+
Quantitative fluorescence measurements									
Arbitrary units (RFI)	—	—	—	—	—	—	+ ^a	—	—
MESF units per fluorochrome, antibodies									
bound per cell	—	—	—	—	—	—	—	+	—
Antibody binding capacity	—	—	—	—	—	—	—	—	+

*Suitability for the specified function: + good; ± poor; — none.

^aDue to the lack of spectral matching between standards and sample, Type IIA or IIIA standards only yield consistent results for a single instrument, but not between multiple instruments (for explanation, see text).

^bWhen used in combination with type IIIB and IIIC calibration standards.

Availability of Various Types of Standards for Instrument Set-up and Calibration

Classification of beads		Sources								
Type	Subtype	BDIS ¹	Biocytex ²	Coulter ³	DAKO ⁴	FCSC ⁵	Mol. Probes ⁶	Polysciences ⁷	Sigma ⁸	Spherotech ⁹
0	(Certified Blank)				Certified blank	Certified blank			Certified blank	
I	A						AlignFlow	Fluoresbrite		
(Alignment)	B	DNA QC particles		Flow-Chek			AlignFlow Plus			
II	A			Flow-Set			PeakFlow	Fluoresbrite		Fluorescent particles
(Reference)	B	CaliBRITE			Ref. Standards QC3, QCWindows Simply Cellular Fluorospheres	Ref. Standards QC3, QCWindows Simply Cellular			Microbead kits QCWindows	
III	C			Immuno-Brite			LinearFlow	Fluorescent Intensity Kit		Rainbow Particles
(Calibration)	A									
	B	QuantiBRITE			Quantum MESF Kits	Quantum MESF Kits			Quantum MESF kits	
	C		QIFIKIT		QIFIKIT Quantum Simply Cellular	Quantum Simply Cellular			Quantum Simply Cellular	

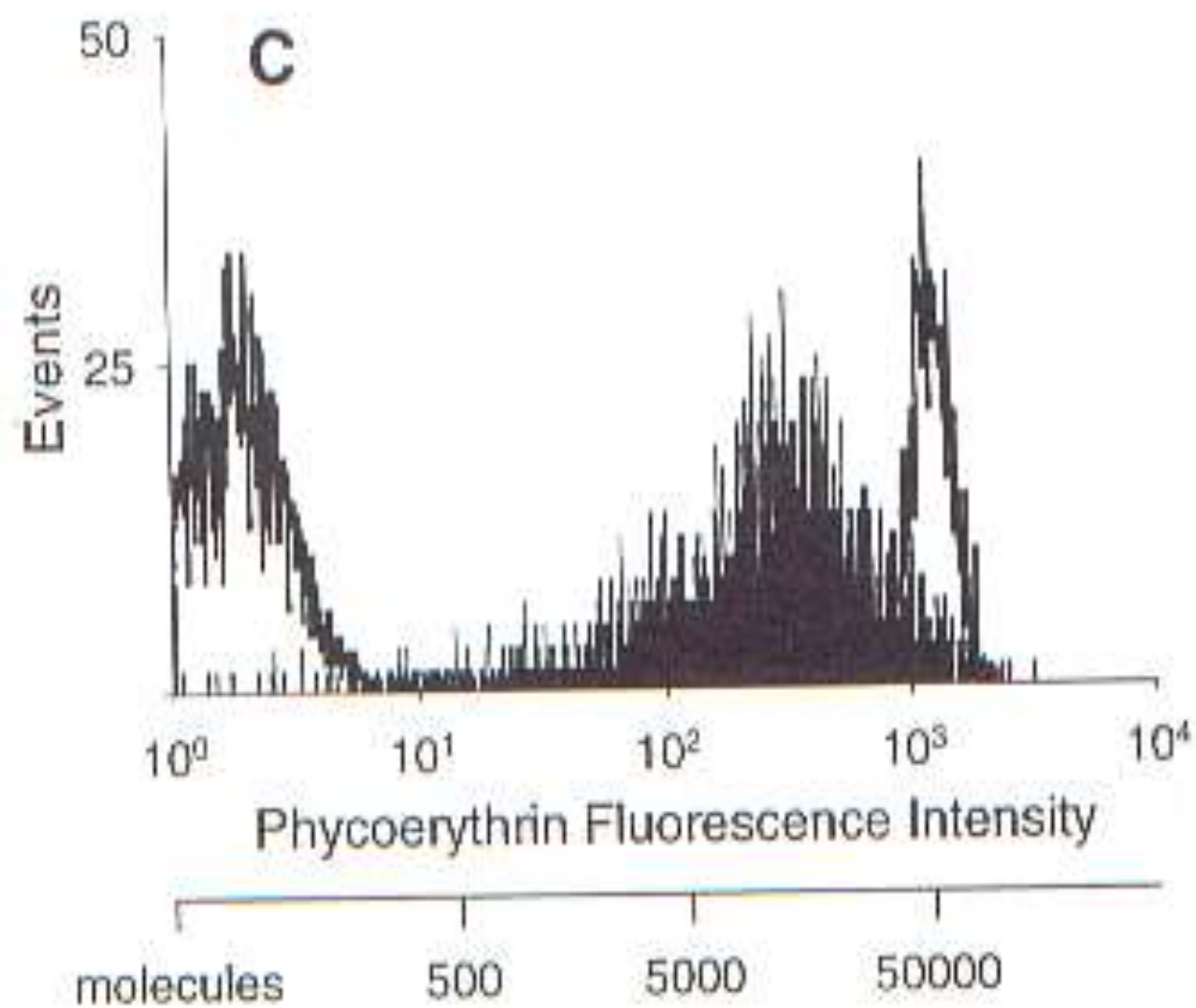
¹Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA.²Biocytex, Marseille, France.³Coulter Corp., Hialeah, FL, and Coulter/Immunotech, Marseille, France.⁴DAKO, Glostrup, Denmark/Carpinteria, CA.⁵Flow Cytometry Standards Corporation, San Juan, PR.⁶Molecular Probes, Eugene, OR.⁷Polysciences, Warrington, PA.⁸Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.⁹Spherotech, Libertyville, IL.

Τα QSC σήμερα
Polysciences, Bang labs

Η έκφραση του CD4 ως βιολογικού δείγματος αναφοράς στη QFCM

- ♦ Συντελεστής μεταβλητότητας έκφρασης CD4 μεταξύ ατόμων 4,9%
- ♦ CD4-PE, F/P = 1/1

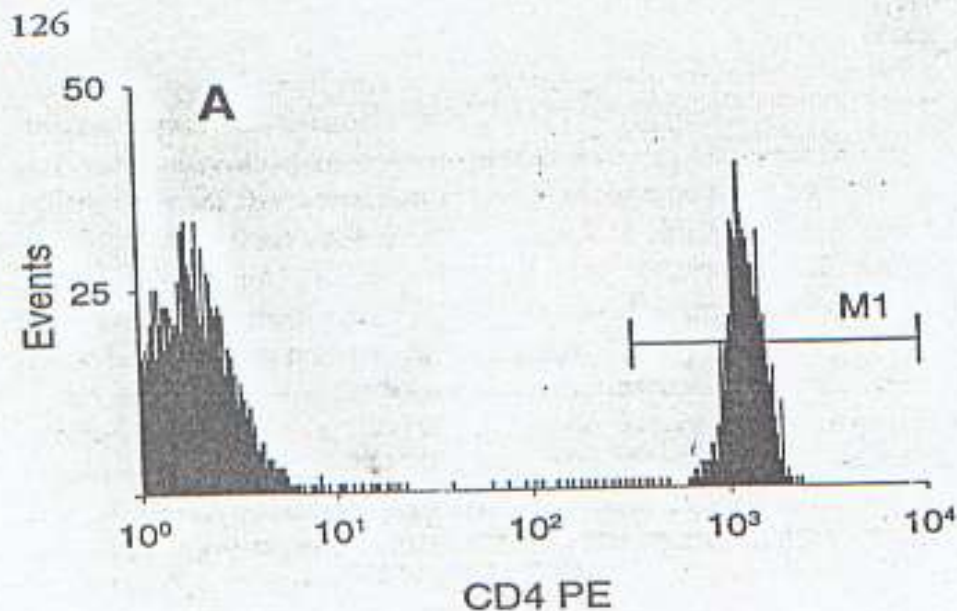
50000 CD4 μόρια / CD4 κύτταρο



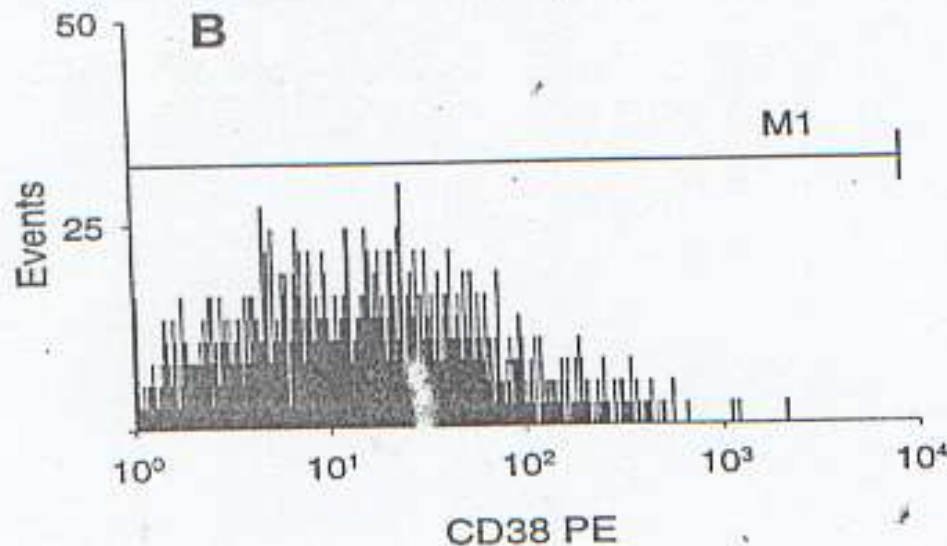
Στατιστική παράμετρος

(κατάλληλη για την εκτίμηση της έντασης φθορισμού)

- ♦ διάμεση
- ♦ μέση ένταση φθορισμού
- ♦ θέση καναλιού κορυφής
- ♦ Τοποθέτηση ζωνών έντασης φθορισμού (binning)



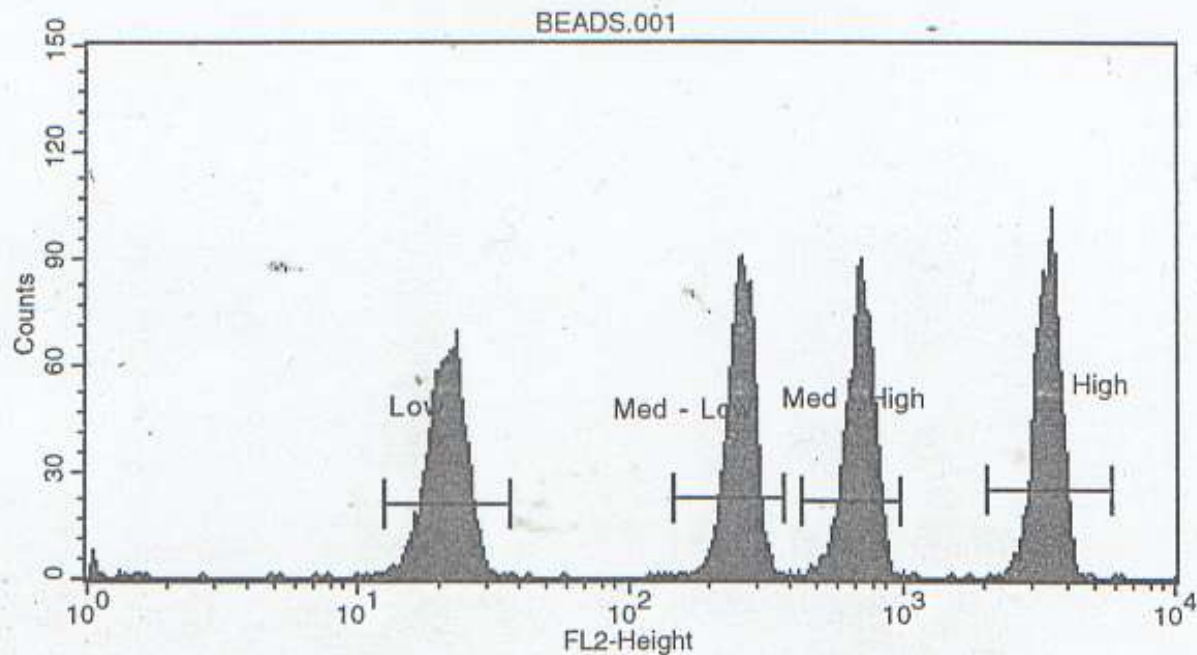
Κατανομή με
στενό CV : όλα
τα θετικά
κύτταρα
μεπαρόμοιο
αριθμό
αντιγόνων



Continuum : τα
κύτταρα
ευρίσκονται σε
διαφορετικά
στάδια
απόκτησης του
αντιγόνου

Ταξινόμηση συνεχούς κατανομής φθορισμού (δείκτες ενεργοποίησης)

- ♦ Τοποθέτηση καταλλήλων για το αντιγόνο ή το κύτταρο τιμών έντασης (bins)
- ♦ Προσδιορισμός των ποσοστών κυττάρων σε κάθε ζώνη



Histogram Statistics

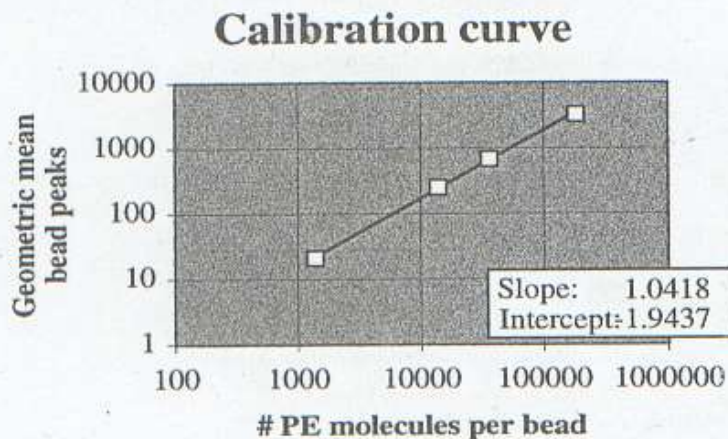
File: BEADS.001
 Sample ID: BEADS
 Gate: Singlets
 Total Events: 10000

Log Data Units: Linear Values
 Acquisition Date: 06-Mar-01
 Gated Events: 9507
 X Parameter: FL2-H FL2-Height (Log)

Marker	Left, Right	Events	Geo Mean	CV
All	1, 9910	9507	319.06	124.68
Low	12, 36	2393	20.75	14.38
Med - Low	143, 362	2383	248.42	10.57
Med - High	422, 965	2251	675.47	11.23
High	2017, 5829	2423	3263.51	9.91

Quantitation Calculations

Step 1: Click "Open..." button to select an assay file acquired with CellQuest's quantitative calibration feature



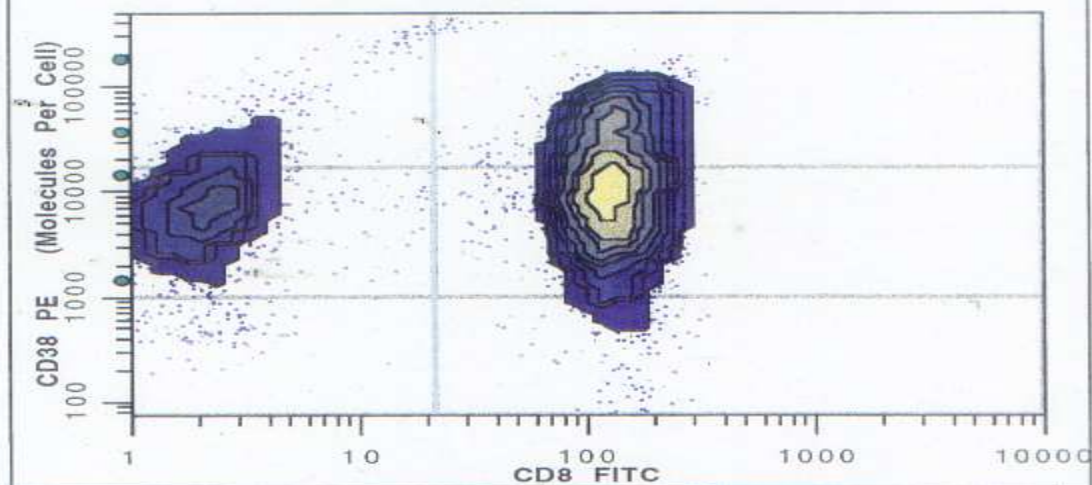
# PE molecules per bead	Geometric means of bead peaks (linear fluorescence)
1400	20.7
14000	248.4
36600	675.5
182000	3263.5

Step 2: Input means or medians of populations of interest (linear fluorescence) and read the number of PE molecules bound

Means or medians (linear fluorescence)	# PE molecules bound
10	670
50	3138
100	6105
120	7273
200	11875
250	14712
300	17526
350	20321
400	23100
450	25865
500	28618
500	28618

QuantiCALC

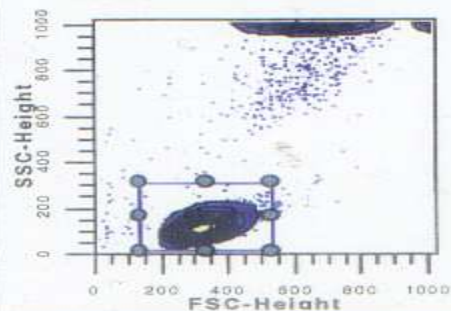
Test1: Pop1: LYMPHS



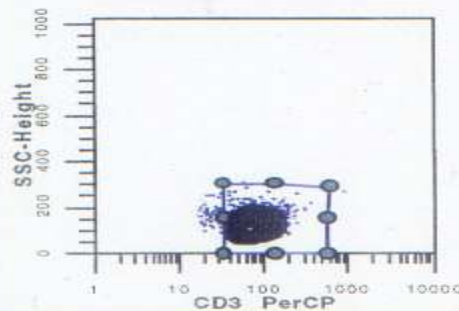
Zone Statistics for 70A4.005

%Gated	9.03	26.55
%Total	5.40	15.88
Events	270	794
Y Median	36780.31	36939.44
%Gated	19.22	36.98
%Total	11.50	22.12
Events	575	1106
Y Median	5796.70	6211.25
%Gated	3.31	4.91
%Total	1.98	2.94
Events	99	147
Y Median	548.93	499.19

Gate1: LYMPHS

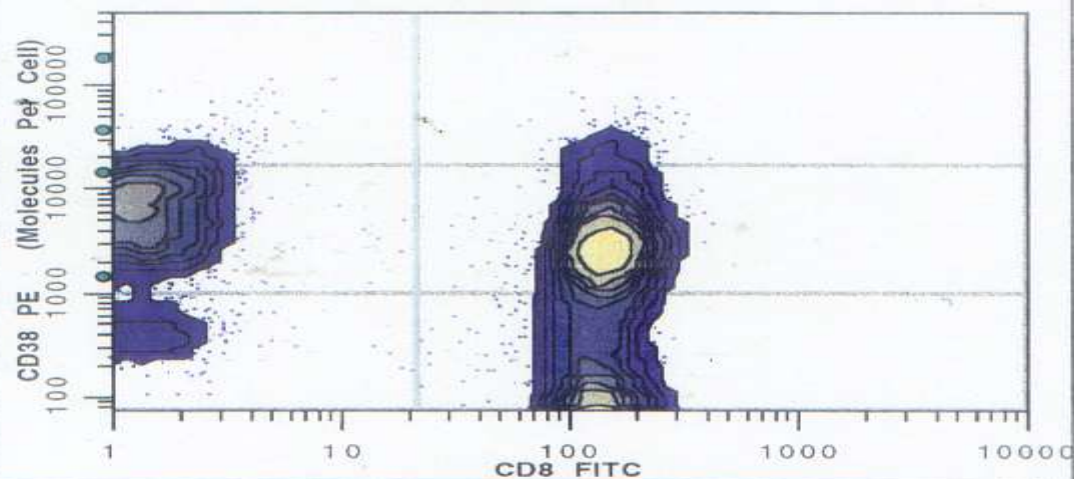


Gate2: CD3+



QuantiCALC

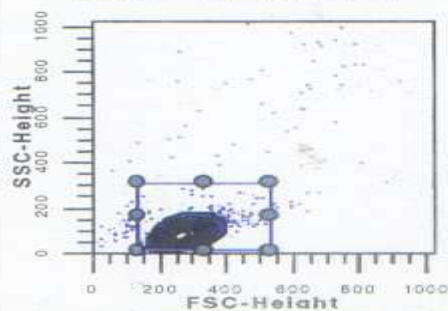
Test1: Pop1: LYMPHS



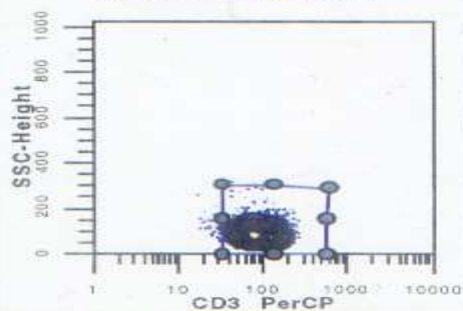
Zone Statistics for 412A.004

%Gated	5.65	4.67
%Total	5.30	4.38
Events	265	219
Y Median	23074.48	27661.49
%Gated	24.01	32.41
%Total	22.52	30.40
Events	1126	1520
Y Median	5456.74	3167.40
%Gated	7.33	25.93
%Total	6.88	24.32
Events	344	1216
Y Median	412.83	232.50

Gate1: LYMPHS



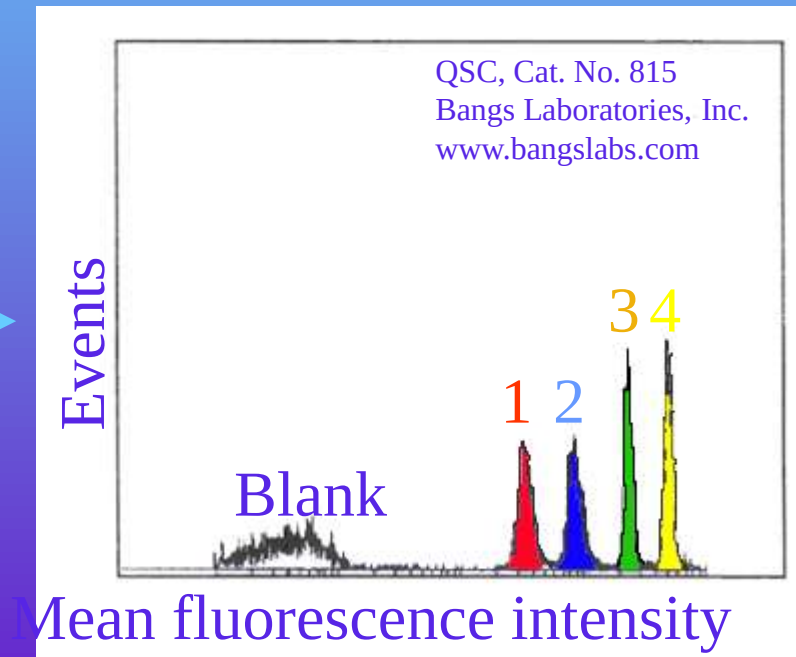
Gate2: CD3+



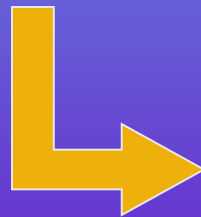
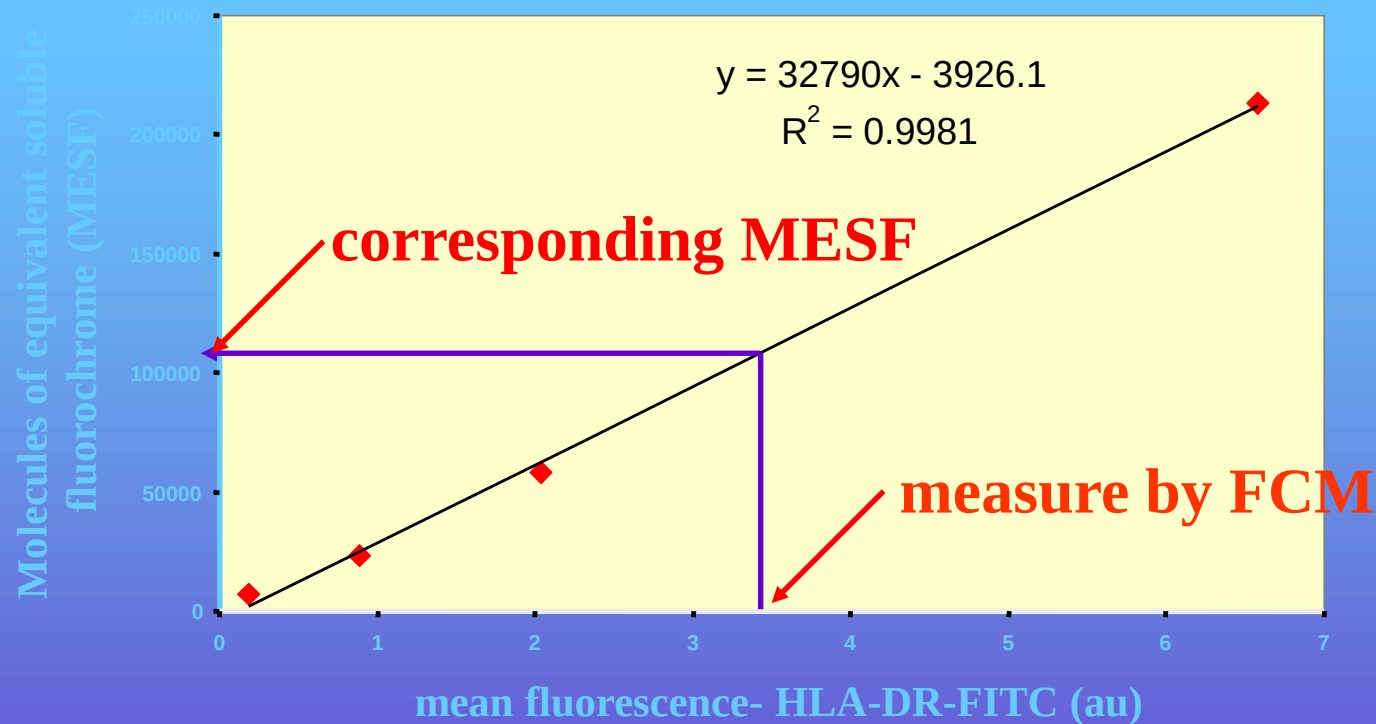
QSC Beads (Quantum Simply Cellular)

Identical microbeads with various calibrated binding capacities of goat-anti-mouse IgG on their surface :

Antibody binding capacity (ABC) provided by the manufacturer :



Quantum Simply Cellular Beads Calibration Curve



Binding capacity
of cells in your sample

EVAGELISMOS HOSPITAL

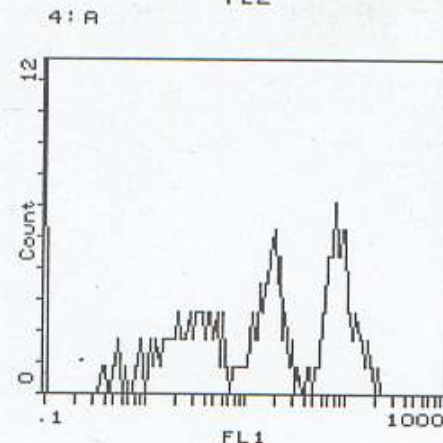
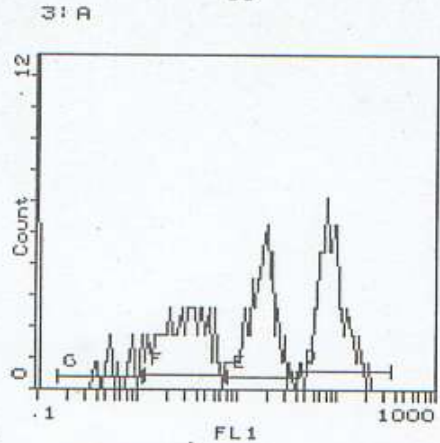
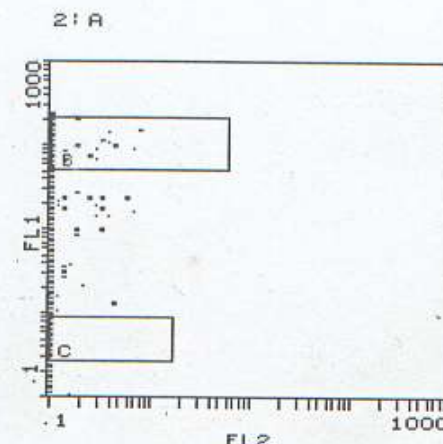
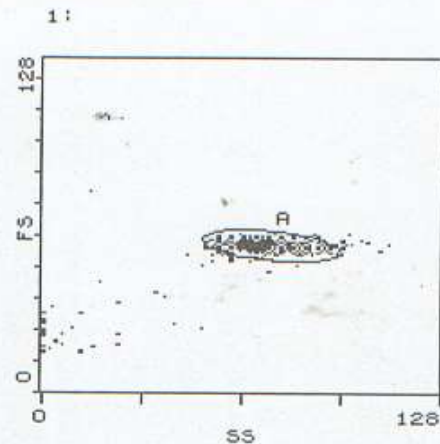
COULTER(R) EPICS(R) Acquisition Flow Cytometry Report

25Oct00 12:02:02
SAMPLE CELLQUANT CD38/8
Z0085188

OP ID: KATERINA

Initial cytosett. from prot. SAMPLE CELLQUANT CD38/8

48 seconds, 2093 events
Manual Stop



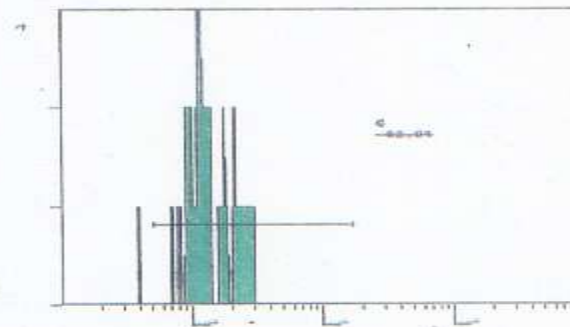
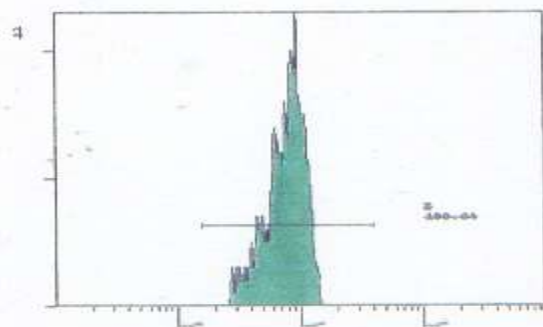
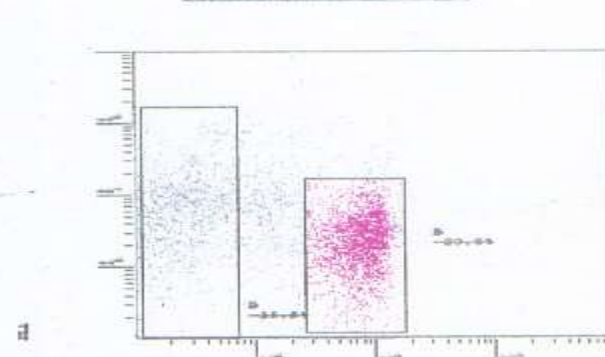
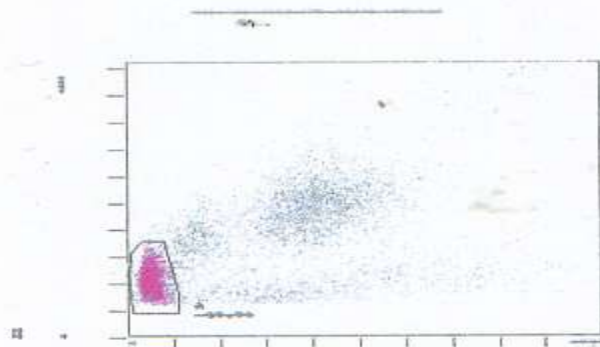
Stats: Not Normalized,

Listgating: Disabled

Hist	Region ID	%	PkPosX	PkPosY	Count	Mn X	Mn Y	MnI X	MnI Y
1	A AUTO	76.4	68.0	56.0	1599	72.6	55.6	72.6	55.6
2	B B	29.9	0.102	82.5	478	0.118	94.9	0.139	102.9
	C C	4.57	0.102	0.536	73	0.106	0.544	0.111	0.593

Hist	Region ID	%	PkPosX	Count	Min	Max	Mn X	MnI X
3	D D	31.0	107.1	495	44.8	367.3	97.3	103.3
	E E	26.3	14.8	420	8.25	42.4	18.7	19.8
	F F	28.0	1.68	447	1.23	8.10	3.08	3.46
	G G	6.32	0.581	101	0.166	1.16	0.587	0.651

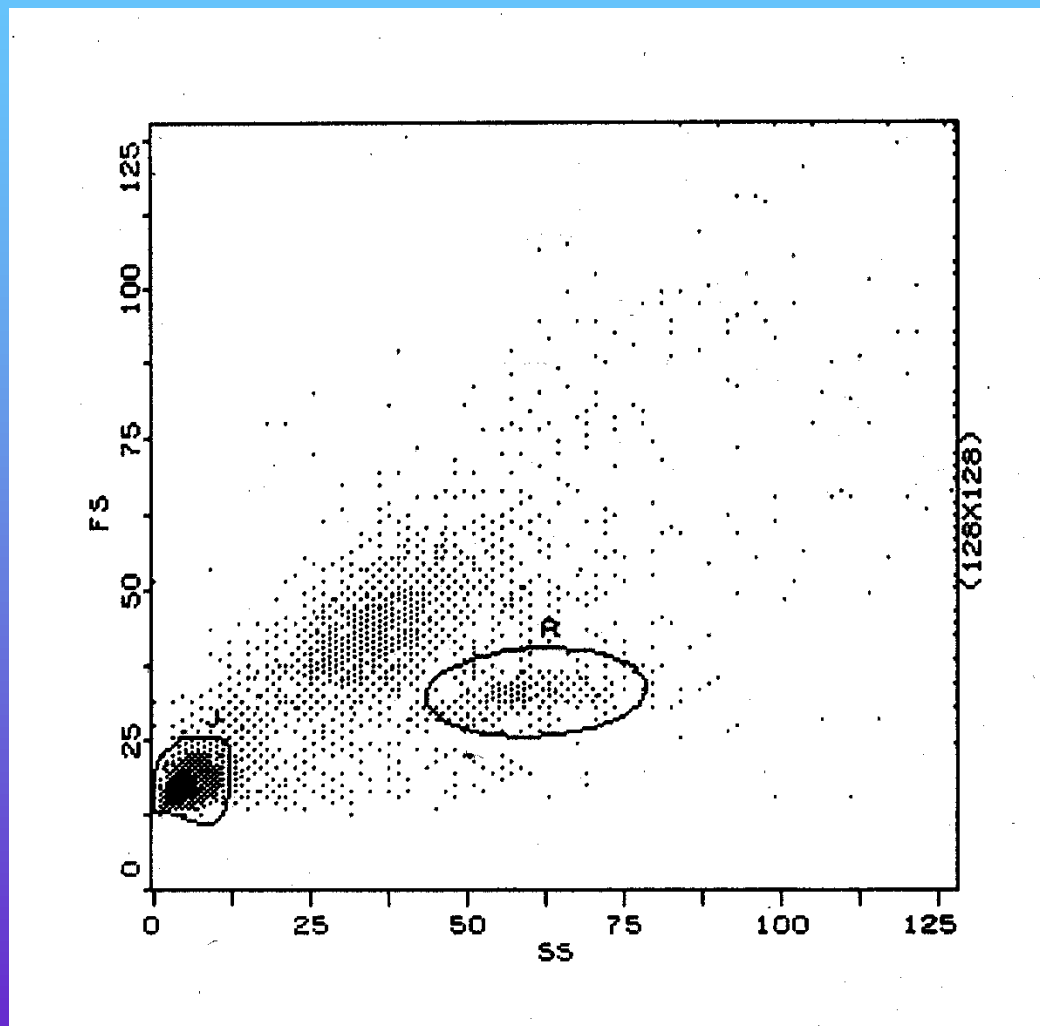
CELLQUANT CD38/CD8



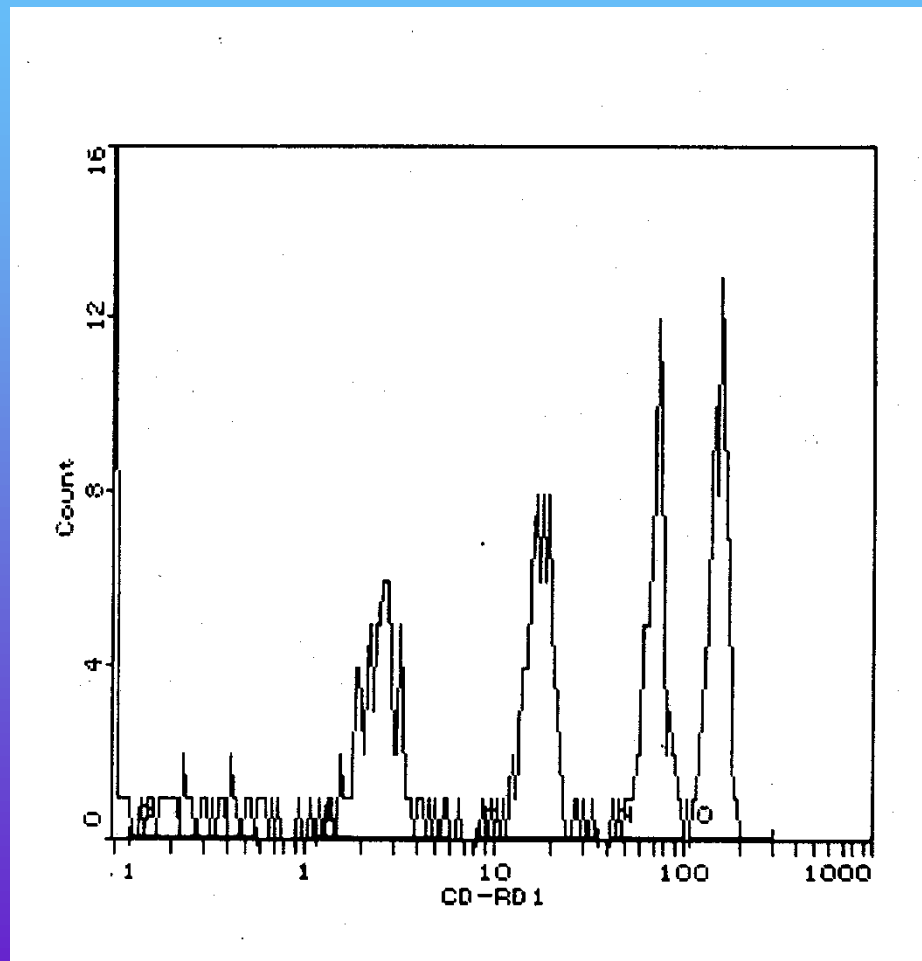
SAMPLE

CONTROL

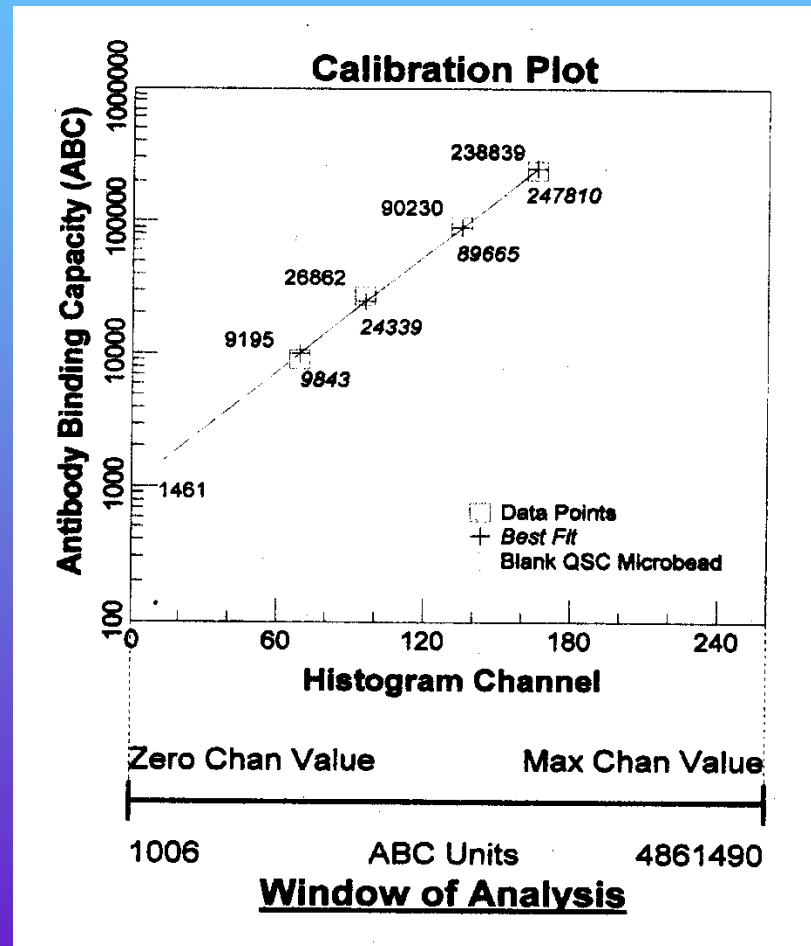
Οριοθέτηση λεμφοκυττάρων - σφαιριδίων



Κατανομή εντάσεων φθορισμού σφαιριδίων



Καμπύλη αναφοράς εντάσεων φθορισμού - ABC CD95



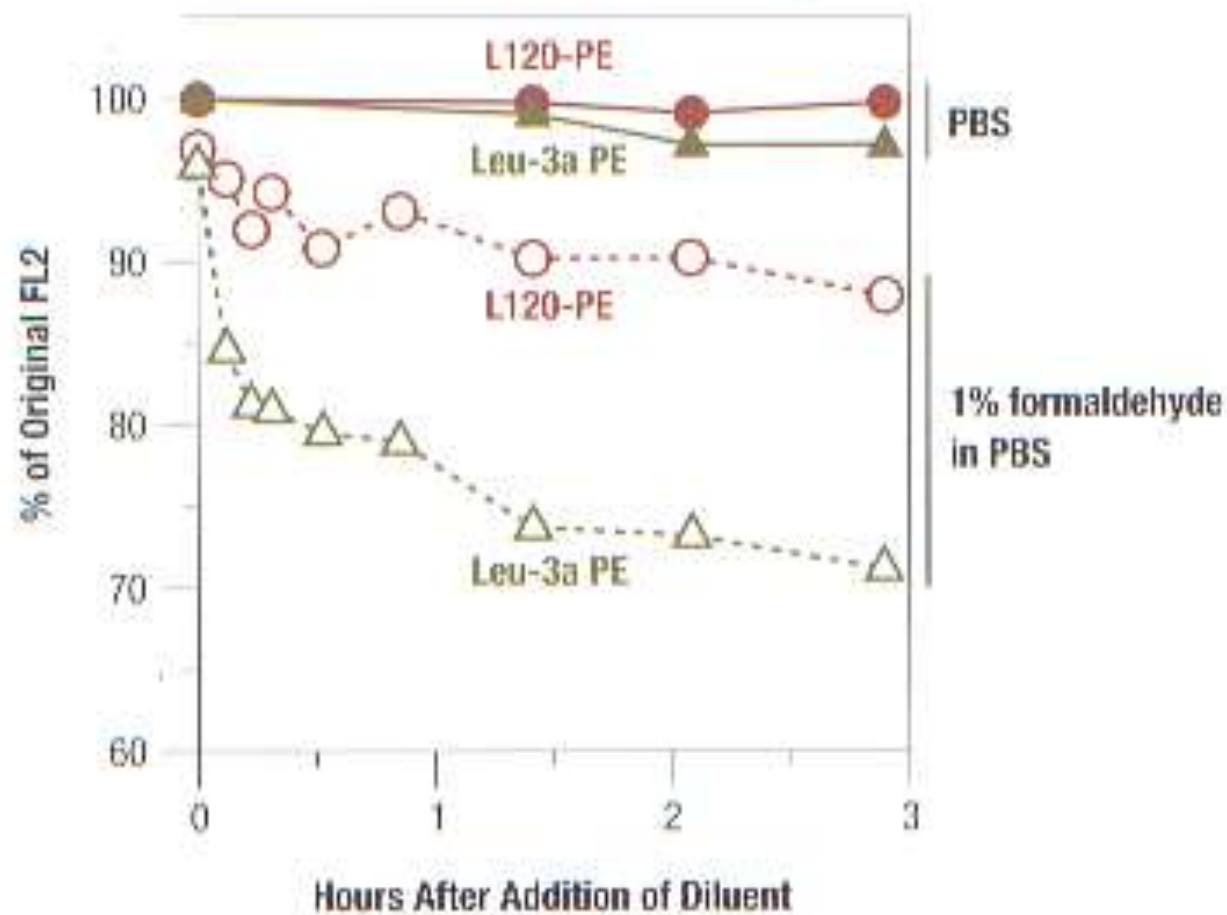
Παράγοντες που επηρεάζουν τις τιμές ABC

- ◆ Στοιχειομετρία σφαιριδίου-αντισώματος
- ◆ Αναλογία συγκεντρώσεων αντισώματος-σφαιριδίων-κυττάρων
(απαιτούνται συνθήκες κορεσμού)
- ◆ Μέθοδοι μονιμοποίησης (π.χ. παραφορμαλδεΰδη)
- ◆ Τύπος MoAb (κατασκευαστής, κλώνος)

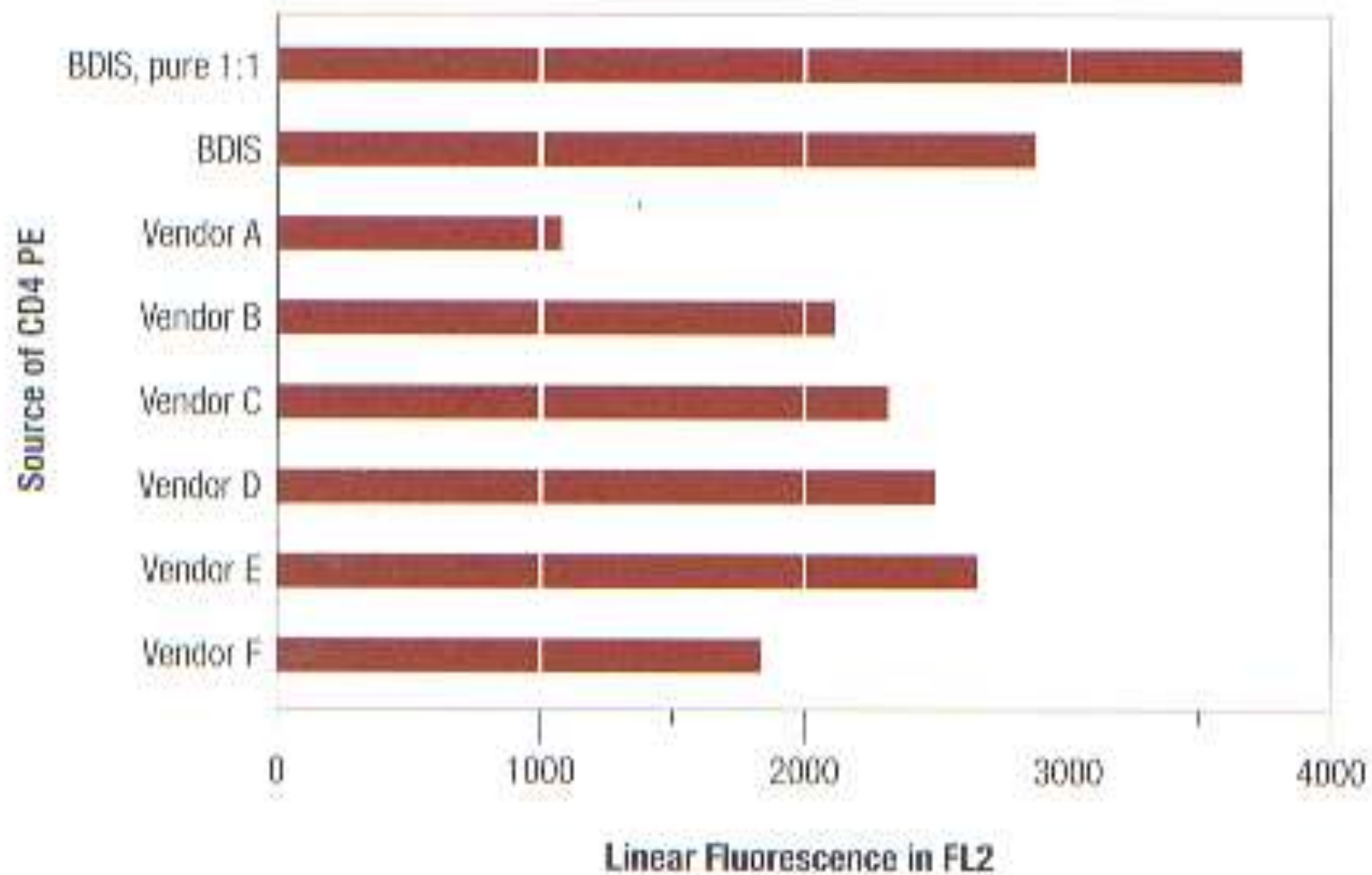


Το CD45 σε
διαδοχικές
αραιώσεις

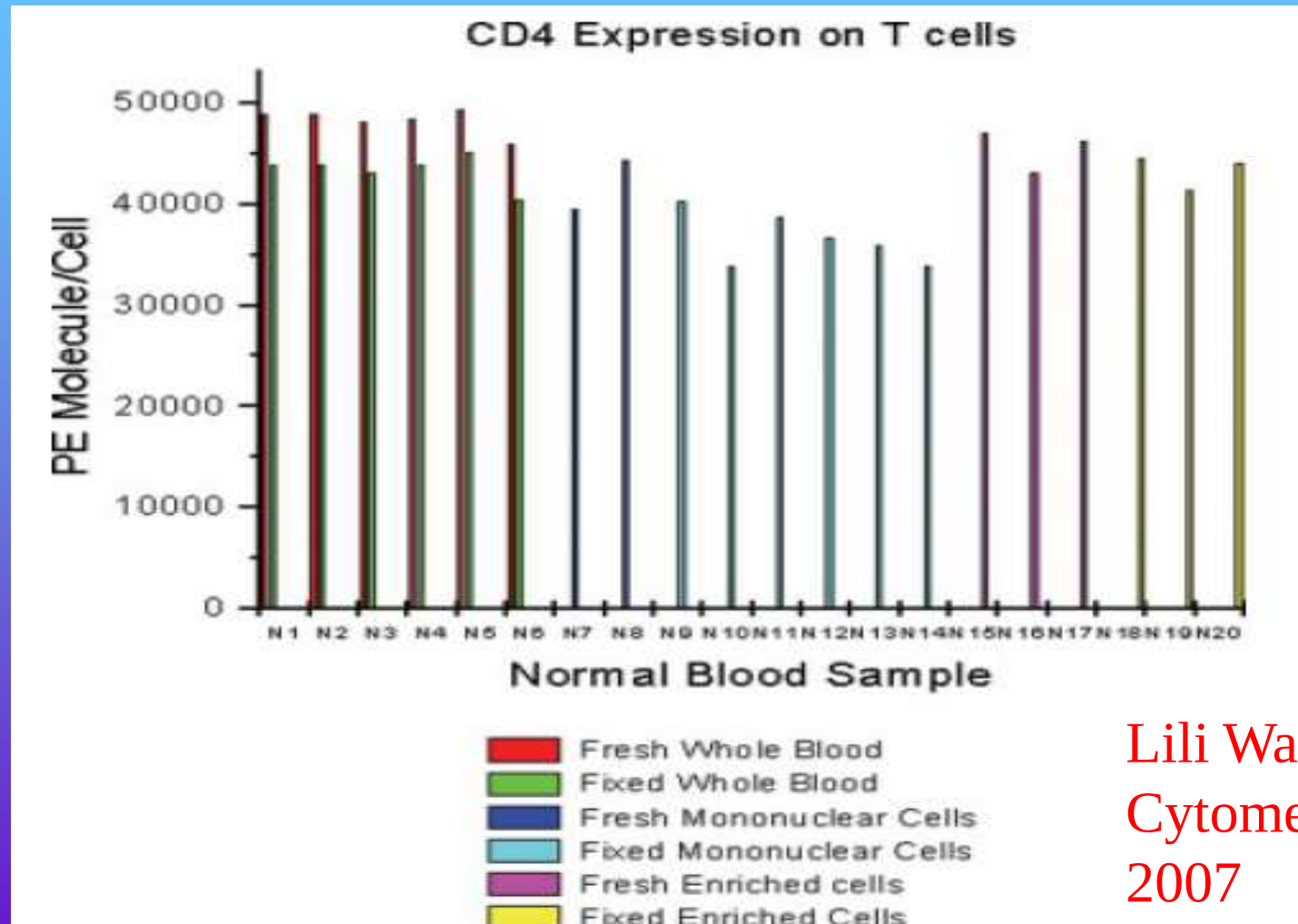
Cells Stained with Different CD4 PE



Lymphocytes Stained with Different CD4 PE



Αριθμός μορίων PE ανά κύτταρο με Quantibrite και CD4-PE



Lili Wang et al
Cytometry
2007

Ασύμβατες τιμές με χρήση διαφορετικών συζευγμάτων

Table 1

ABC Values Obtained for CYTO-TROL Cells and Different Sample Preparations by Using Both CD4-PE and CD4-FITC Conjugates

Samples	ABC		CD4-FITC revised 15% for pH effect
	CD4-PE	CD4-FITC	
CYTO-TROL	43,090	34,734	40,864
Fresh whole blood	48,321	22,156	26,066
Fixed whole blood	43,432	17,879	21,034
Fresh mononuclear cells	42,001	19,292	22,697
Fixed mononuclear cells	36,596	ND	ND
Fresh enriched cells	45,480	22,051	25,942
Fixed enriched cells	43,336	20,187	23,749

ND means "not done."

Lili Wang et al
Cytometry
2007

QFCM - Εφαρμογές

Πρωτεϊνική έκφραση

- ◆ Υποδοχείς ιών
- ◆ Προϊόντα ογκογονιδίων
- ◆ Υποδοχείς φαρμάκων
- ◆ Υποδοχείς στεροειδών
- ◆ Πρωτεΐνες απόπτωσης
- ◆ Μόρια προσκόλλησης
- ◆ Πρωτεΐνες ορού (CBA)

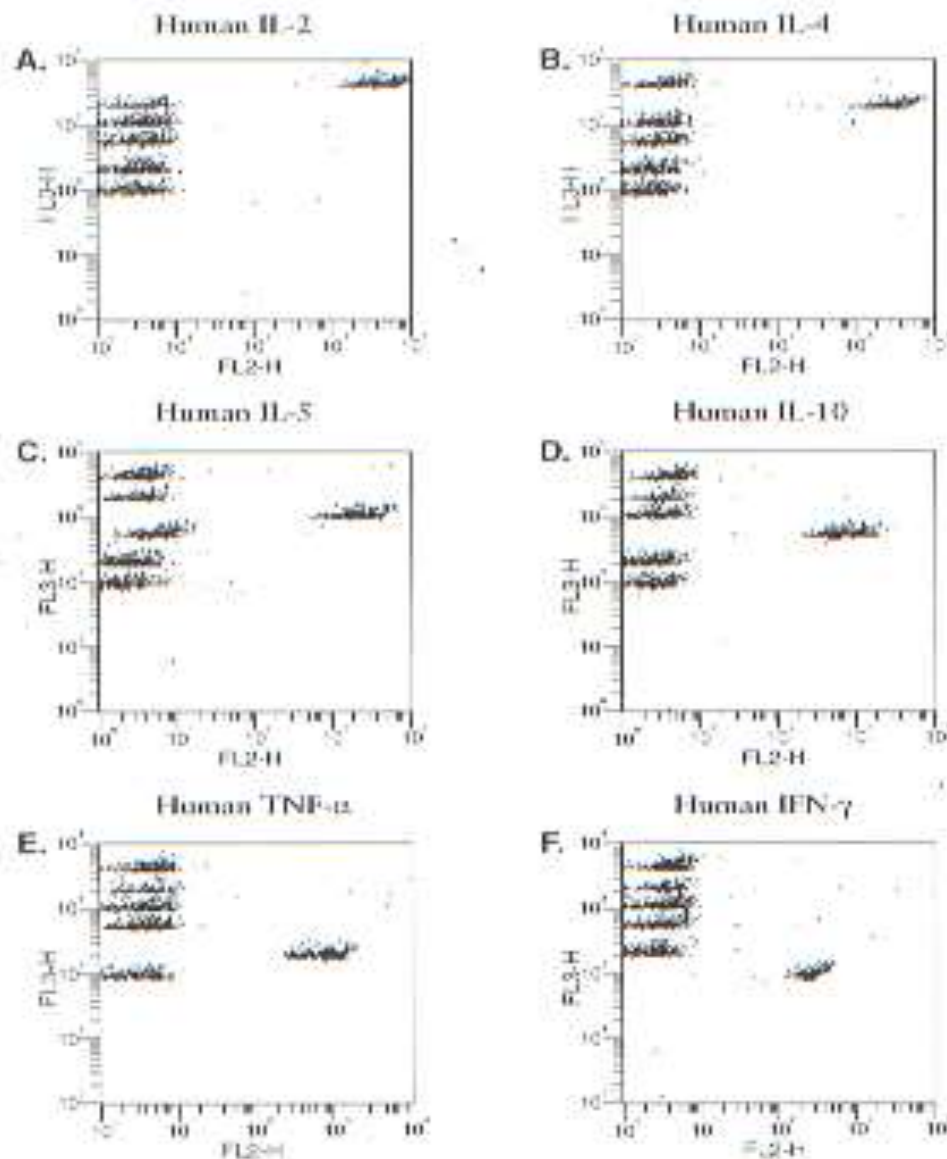


Figure 8: CellQuest data for detection of individual cytokines

QFCM – Κλινικές εφαρμογές

Συνδυασμός ανοσοφαινότυπου και QFCM

- ♦ Δείκτες κυτταρικής ενεργοποίησης, ωρίμανσης και διαφοροποίησης
CD38, CD25, HLA-DR, CD71 – λεμφοκύτταρα
HLA-DR – μονοκύτταρα
CD62 – αιμοπετάλια
- ♦ Προγεννητική διάγνωση, ανάλυση «σπανίων» κυττάρων (rare event analysis) (CD34)

QFCM – Κλινικές εφαρμογές

Συνδυασμός ανοσοφαινότυπου και QFCM

- ◆ Ταυτοποίηση μη αναμενόμενων φαινοτύπων σε λευχαιμίες, λεμφώματα
- ◆ Ανίχνευση ελαχίστης υπολειμματικής νόσου

QFCM – Κλινικές εφαρμογές

Συνδυασμός ανοσοφαινότυπου και QFCM

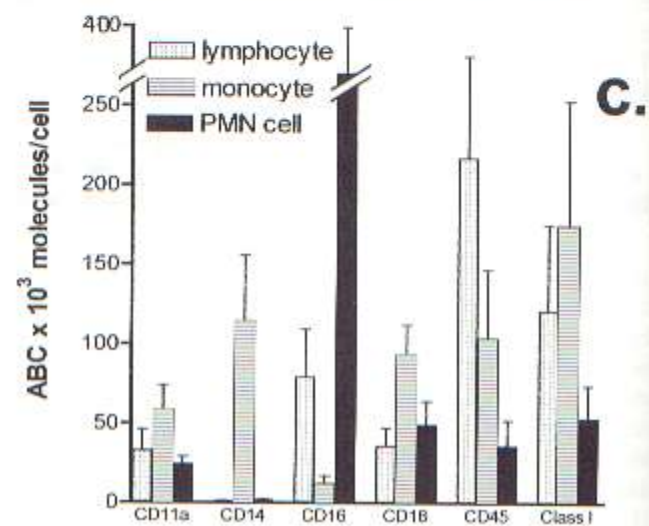
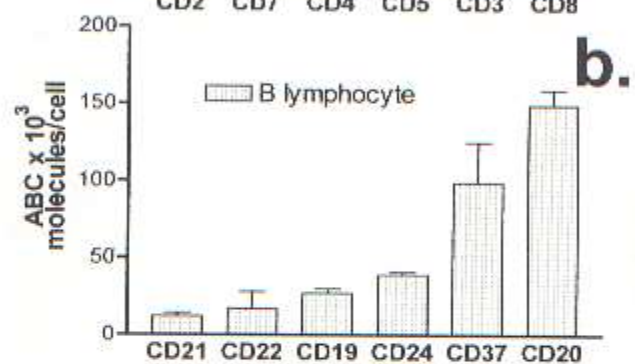
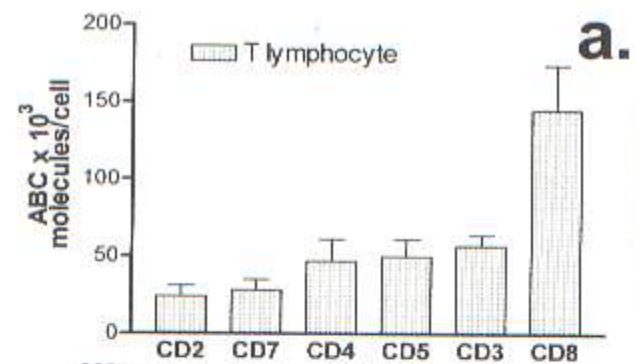
- ♦ Διασταύρωση (cross – match) για μεταμόσχευση οργάνων

Ποσοτικοποίηση αντιγόνων επιφανείας σε φυσιολογικά άτομα (Denny et al,1996)

	ABC (QSC)
CD3+	134349- 45905
CD4+ (lymph)	54174- 35106
CD4+ (mono)	9246- 3094
CD8+	268868-190622
CD3+CD8+	269858-212024
CD16+	38307- 336
CD19+	25252- 11689

Ποσοτικοποίηση αντιγόνων επιφανείας σε φυσιολογικά άτομα (Bikoue et al,1996)

	ABC (QIFI) X10 ³
T cells antigens	
CD2	24±7
CD3	57±7
CD4	47±14
CD5	50±11
CD7	28±7
CD8	145±29
B cells antigens	
CD19	27±3
CD20	149±10
CD21	12±2
CD22	17±2



QFCM στην ALL - MRD

(Farahat et al, 1995, 1998)

Normal values

•Tdt+ $>100 \times 10^3$

•CD10+ $< 50 \times 10^3$

•CD19+ $< 10 \times 10^3$

B-ALL

•Tdt+ $<100 \times 10^3$

•CD10+ $> 50 \times 10^3$

•CD19+ $> 10 \times 10^3$

QFCM σε B λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα (Farahat et al, 1998)

B cells	CD19(ABC*10 ³)	CD20 (ABC*10 ³)
N.C.	22	94
B-CLL	13	65
B-PLL	16	129
SLVL	15	167
MCL	10	123
HCL	38	312

QFCM αντιγόνων T κυττάρων (Ginaldi et al, 1995)

T cells	CD3(ABC*10 ³)	CD7(ABC*10 ³)
N.C.	124	20
T-ALL	30	35
ATLL	38	13
T-PLL	92	29
LGL	95	12

QFCM – το μέλλον

- ♦ υλικό αναφοράς (standard reference material)
NIST για την ένταση φθορισμού από NIST
- ♦ Μικροσφαιρίδια αναφοράς συνδεδεμένα με FITC,
βαθμονομημένα σε MESF από NIST
- ♦ QFCM - Οδηγίες consensus

Bridging the Gap

