

Ανάπτυξη ειδικών δοκιμασιών και πρωτοκόλλων Πολυχρωματική ΚΡ

Μαριάννα Τζανουδάκη
Τμήμα Ανοσολογίας & Ιστοσυμβατότητας
Εξειδικευμένο Κέντρο Πρωτοπαθών Ανοσοανεπαρκειών-Παιδιατρική Ανοσολογία
Γ.Ν. Παίδων Αθηνών «Η Αγία Σοφία»

Η μετάβαση από τα 5 στα 10...στα 16...
χρώματα

Θεωρητικά θέματα:
Αλληλεπιδράσεις φθ. χρωστικών...
Ρυθμίσεις μηχανήματος...
Κατάλληλοι συνδυασμοί...
Προτύπωση...
Έλεγχος ποιότητας...
Ανάλυση δεδομένων...

Ερωτήματα που πρέπει να απαντήσουμε:

Ποιους δείκτες θέλουμε να ελέγχουμε;

Πόσους δείκτες θα ελέγχουμε;

Με τι χρώματα θα τους συνδυάσουμε;

Πάνελ

Ποια προαναλυτική διαδικασία θα εφαρμόσουμε;

Ποια στρατηγική οριοθέτησης θα έχουμε;

Πώς θα σιγουρευτούμε για την ποιότητα των αποτελεσμάτων;

Πως θα αναλύσουμε τα αποτελέσματα;

Πώς φτιάχνουμε καινούργιο πάνελ;

**Συμβουλευόμαστε ήδη δημοσιευμένα
(OMIPs, EuroFLOW, ELN, current protocols, άρθρα)**

Αν δεν υπάρχουν παρόμοια;

Αν δεν μπορούμε να τα εφαρμόσουμε;

Αν πρέπει να κάνουμε τα πάντα
από την αρχή;;;



Ποιους δείκτες θέλουμε να ελέγξουμε;

Χαρακτηριστικοί σειράς (CD3, CD19...)

Διαφοροποίησης / ωρίμανσης (CD10, CD20, CD27...)

Λειτουργικότητας (Igs, CKs)

Χαρακτηριστικοί συγκεκριμένου υποπληθυσμού
(Vα24, Vβ11...)

Αποκλεισμού (dump channel)

Βιωσιμότητας (7AAD, Syto...)

**Πάλι κοιτάμε OMIPs OMIPs, EuroFLOW, ELN,
current protocols, άρθρα!!!**

**Μπορεί να μην ταιριάζουν απόλυτα,
αλλά παίρνουμε ιδέες!!**

Τι φθορίζουσες χρωστικές για κάθε δείκτη;

Χωρίζουμε τους δείκτες σε:

«Εύκολους»:
σαφής διάκριση -
/+)
CD3, CD19...

«Ενδιάμεσους»:
όχι σαφής
διάκριση -/+
Γνωστή έκφραση
HLADR. CD45RA...

«Δύσκολους»
Ασθενής έκφραση,
όχι καλά
μελετημένοι,
σε σπάνιους
πληθυσμούς

Τα πιο
προβληματικά/
ασθενή χρώματα
PB, KRO
ECD

Τα χρώματα που
επηρεάζονται
λιγότερο από το
spillover
FITC, PB...

Τα πιο έντονα
χρώματα
PE, APC, PC7

Επίσης:

ΌΧΙ δείκτες που συνεκφράζονται σε χρώματα με έντονο spillover. ΚΑΛΥΤΕΡΑ σε διαφορετική LASER

Αν δεν γίνεται :

Στο χρώμα που δέχεται πολύ spillover μπαίνει ο βασικός (mother) δείκτης (πχ CD3)

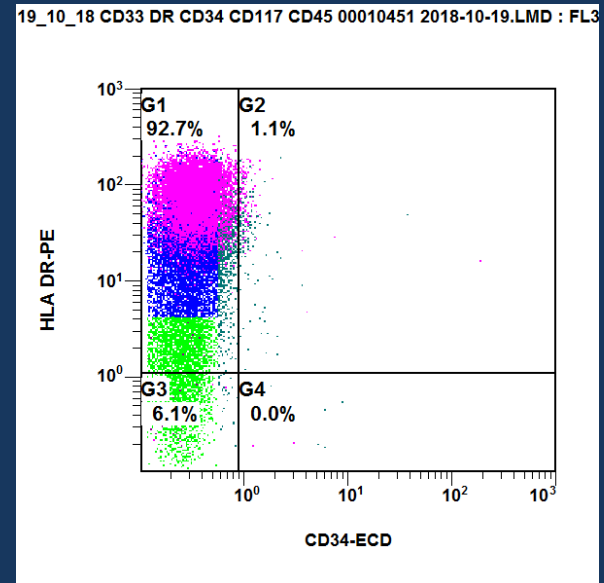
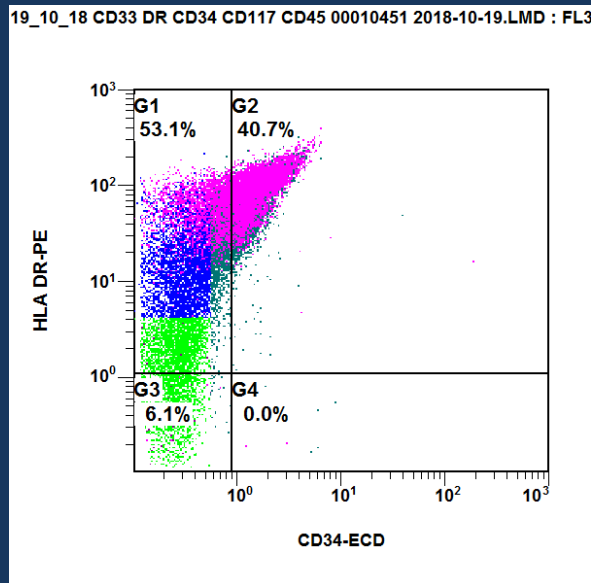
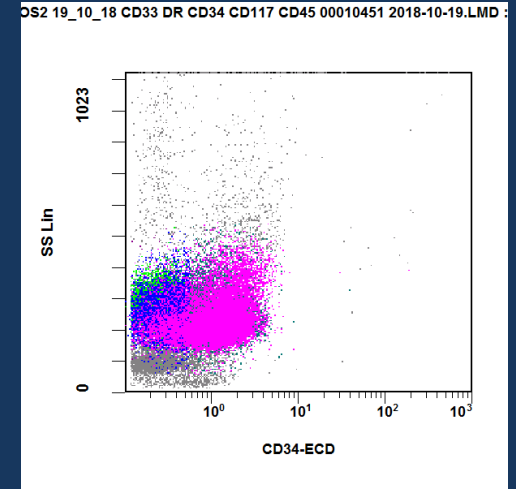
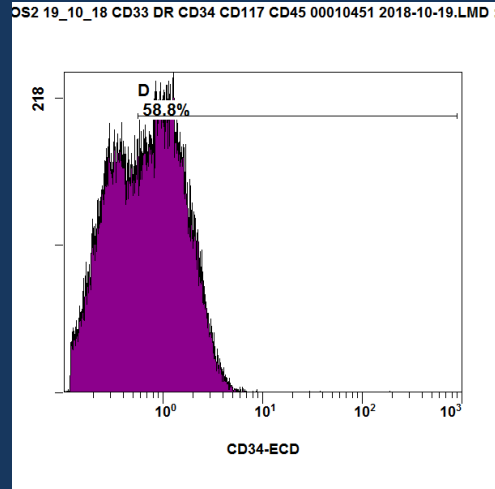
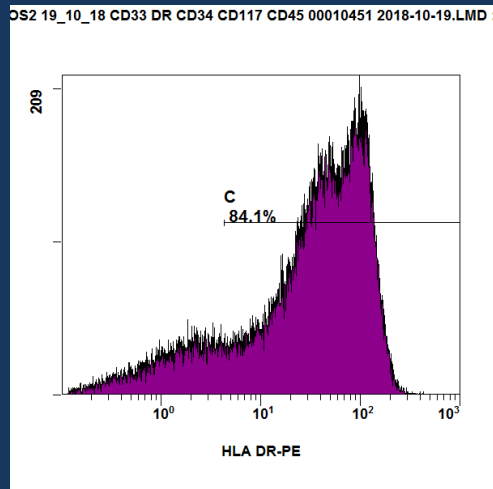
Στο χρώμα που δέχεται λίγο spillover μπαίνει ο δείκτης του υποπληθυσμού (daughter) (πχ CD4)

«Δύσκολο» δείκτη σε χρώμα που ΔΕΝ δέχεται spillover (untouchable). Έντονο δείκτη σε χρώμα που ΔΕΝ προκαλεί spillover (silent) (πχ. αν έντονο δείκτη στο PE/ πρόβλημα στο ECD!!!)

Σε τέτοια ζεύγη με έντονο μεταξύ τους spillover μπαίνουν καλύτερα δείκτες που σίγουρα ΔΕΝ συνεκφράζονται (CD3/CD19)

Δείκτες που σίγουρα ΔΕΝ συνεκφράζονται μπαίνουν και στο ίδιο χρώμα !!! (CD19/CD8)

Τι γίνεται στο ECD όταν μπει έντονος δείκτης στο PE





Spillover Spreading Matrix

Detector		BB515	BB630	BB700	BB790	BUV395	BUV496	BUV563	BUV615	BUV661	BUV737	BUV805	BYG546	PE-CF594	PE-Cy5	PE-Cy5.5	PE-Cy7	APC	AF700	APC-H7	BV421	BV480	BV570	BV605	BV650	BV711	BV750	BV786
Fluorochrome	Stain Index																											
BB515	170		0.52	0.21	0.23			0.14				0.14	0.26	0.29			0.17	0.15	0.15	0.18			0.37	0.56	0.11			0.35
BB630	138			0.81	0.72	0.20			2.29	0.70	0.41	0.46	0.71	3.10	0.62	0.58	0.37	0.82	0.22	0.13	0.41	0.26	1.03	5.83	1.23	0.97	1.77	1.02
BB700	169		0.40		3.29	0.36			0.10	1.38	1.31	1.52	0.18	0.22	0.67	1.82	1.16	8.03	2.25	1.54	1.09	0.19	0.44	0.42	0.68	5.19	5.93	3.43
BB790	124		0.89	0.39		0.52				0.17	0.55	3.53	0.12	0.40	0.13	0.18	1.42	0.39	0.36	0.86	0.66		0.80	0.66	0.38	0.49	3.07	4.18
BUV395	89			0.10			2.90	1.00	0.28			0.24	0.78					0.20		0.15	0.10	0.56	0.40	0.22	0.19	0.23	0.41	0.44
BUV496	22	0.26	0.20			3.24		1.19	0.89	0.63	0.43	0.50	1.10	0.45					0.25	0.48		1.41	1.62	1.00	0.41		0.72	0.39
BUV563	78	0.25	2.64	0.51	0.35	1.73	1.02		1.83	1.22	0.68	0.71	9.70	3.32	0.68	0.70	0.48	1.06	0.25	0.21	0.31		1.56	1.81	0.22	0.43	0.65	
BUV615-P	167		4.04	0.55	0.53	0.84	0.75	0.24		1.92	1.16	1.51	0.82	5.68	0.74	0.73	0.49	1.60	0.36	0.19	0.11			3.54	0.64	0.58	1.42	0.73
BUV661	145			0.65	0.42	1.11	0.87	0.31	0.40		2.43	2.31	0.29	0.19	0.53	0.58	0.37	10.27	2.12	1.03	0.23	0.19	0.31	0.63	1.06	0.91	1.90	1.10
BUV737	135			1.77	2.06	1.06	0.75	0.32		0.14		8.62	0.16	0.22		0.68	0.42	2.04	3.50	1.56	0.35		0.35	0.29	0.15	1.25	4.50	2.88
BUV805	98				0.28	1.47	1.11	0.37		0.11	0.19		0.23	0.15	0.14	0.10	0.14		0.18	0.63	0.10				0.22		0.41	0.57
BYG546	188	0.10	3.22	0.58	0.51		0.10	0.19	0.37	0.27	0.23	0.31		3.21	0.81	0.76	0.51	0.81			0.23		1.93	2.05	0.45	0.44	0.81	0.48
PE-CF594	207		8.25	1.13	1.10				1.51	0.51	0.33	0.44	1.19		1.39	1.37	0.98	1.52	0.16	0.18	0.20		0.56	5.68	0.57	0.71	1.11	0.82
PE-Cy5	264	0.13	0.52	4.92	2.98	0.46			2.62	0.87	0.85	0.49	0.39		3.93	2.33	10.25	1.99	1.34	0.55	0.24		0.57	1.52	2.37	2.50	1.86	
PE-Cy5.5	243		1.19	6.08	4.41	0.34	0.24		0.84	1.41	1.33	1.09	1.13	1.49		3.36	3.32	1.20	0.91	0.73		0.74	0.72	0.20	3.91	3.04	2.07	
PE-Cy7	181		0.46	0.13	5.28	0.48			0.12	0.40	3.08	0.25	0.32		0.23		0.14	0.29	1.13	0.41	0.18		0.21	0.22	0.26	1.43	3.64	
APC	76			0.42	0.31	0.20			0.16	1.38	0.64	0.70	0.29		0.73	0.57	0.43		2.43	1.35		0.23	0.56		1.08	0.76	1.78	0.91
AF700	116			1.13	0.65	0.31			0.22	0.43	1.53	1.30	0.10		0.36	1.43	0.83	3.06		2.92	0.32			0.21	1.36	2.89	1.63	
APC-H7	46				0.81	0.66			0.13		0.25	2.68		0.22		0.30	1.04	0.71	0.66		0.28	0.59	0.40	0.33	0.41	0.26	1.38	1.66
BV421	347		0.14			2.19	3.32	1.49	0.34	0.11			0.96		0.11							1.19	0.84	0.34	0.15	0.11	0.24	0.11
BV480	66		0.24			2.44	3.40	1.27	0.47	0.27	0.15	0.32	0.87	0.15	0.11		0.16	0.32	0.14	0.13	0.58		2.64	1.68	0.39	0.31	0.69	0.56
BV570	41		1.02	0.28	0.18	0.20	0.52	0.30	0.56	0.44	0.26	0.29	1.11	1.17	0.27	0.33	0.22	0.52	0.20		0.87	0.45		2.24	0.93	0.64	1.53	0.98
BV605	106		1.44	0.42	0.35	0.38			1.34	0.87	0.57	0.72	0.75	1.57	0.46	0.51	0.32	0.64	0.12	0.14	0.48		1.26		1.89	1.30	3.31	1.67
BV650	55			0.41	0.30	0.59			0.66	2.25	1.11	1.18	0.13	0.44	0.36	0.58	0.28	2.72	0.80	0.57	1.80		0.53	2.17		3.06	6.27	3.57
BV711	74			0.99	0.86	0.63			0.16	0.33	2.09	2.04			0.44	0.35	1.24	1.91	0.80	1.22	0.41	0.27		0.52		9.12	5.77	
BV750	74	0.11	0.12	0.36	0.97	0.45		0.15	0.16	0.20	1.77	2.31	0.24		0.21	0.29	0.51	0.77	0.77	0.82	0.34		0.23		1.46		5.45	
BV786	72			0.15	0.58	0.69	0.35		0.14	0.73	3.08	0.18			0.43	0.33	0.41	0.54	0.91						0.66	4.39		

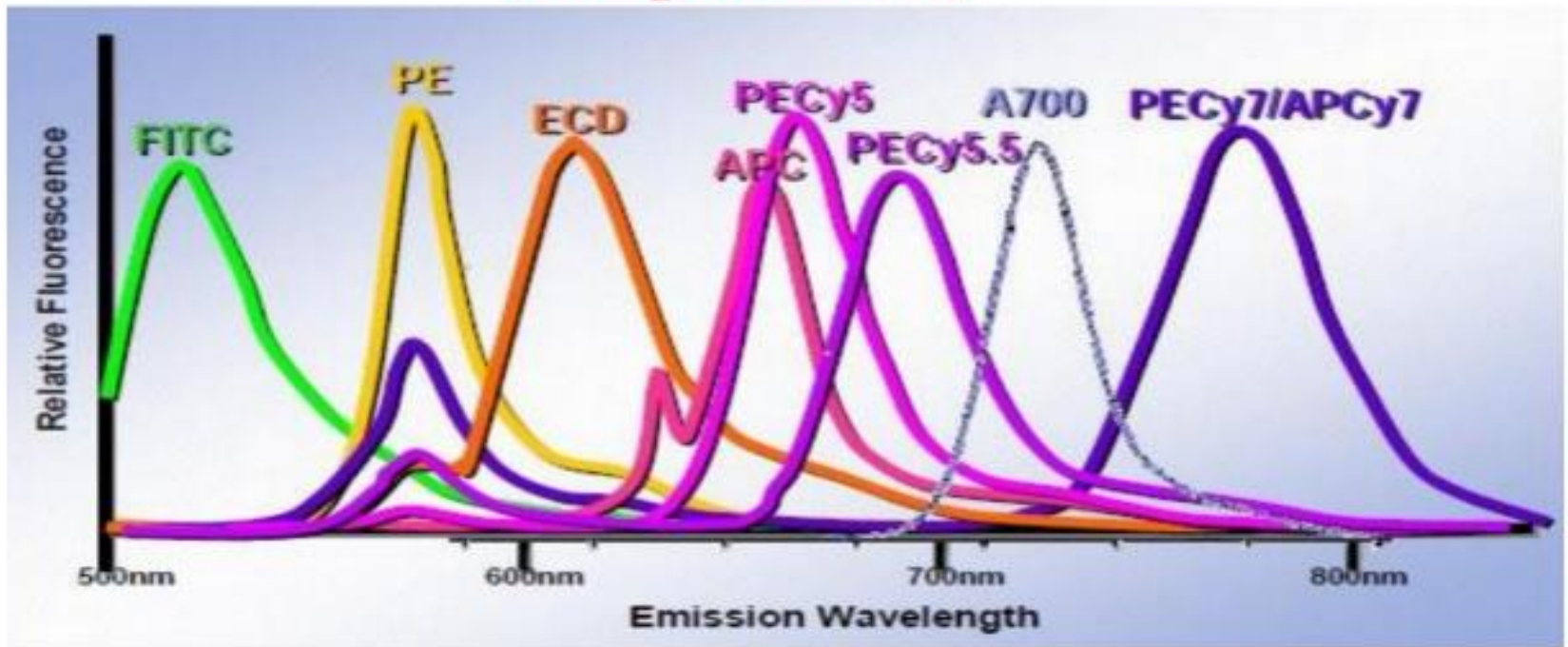
Notes:

- Optimal voltage determined by Aaron T. 'voltration' method
- Whole Blood, CD4s SK3 clone
- Mario, 84th percentile calc. for spread determination
- Autocompensated using single CD4s in FlowJo VX, positive gates on highest peaks

Quantifying spillover spreading for comparing instrument performance and aiding in multicolor panel design.

Nguyen R, Perfetto S, Mahnke YD, Chattopadhyay P, Roederer M. Cytometry A. 2013 Mar;83(3):306-15

Compensation



- In multicolor FCM each fluorochrome emits into a number of another detectors.
- We have to correct spillover in both directions.
- Compensation still accounts for the most frequent errors in implementation of multicolor FCM.

Παράδειγμα 1

Violet		Blue					Red		
PB	KRO	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC Alexa 700	APC Alexa 750

CD45 CD3 CD4 CD8

CD19 CD16 CD56

CD14 CD64

ONE study

Παράδειγμα 2

Violet		Blue					Red		
PB	KRO	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC Alexa7 00	APC Alexa7 50

CD45 CD3 CD4 CD8
CD27 CD28 CCR7 CD45RA
PD1 CD57

Παράδειγμα 3

Violet		Blue					Red		
PB	KRO	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC Alexa 700	APC Alexa 750

CD45 CD3 CD4 CD8

CD19 CD16 CD56

HLADR CD69 CD38

CD25 CD127 CD14

OMIP 23

Χρειάζονται δοκιμές!!!
Δεν είναι σίγουρο ότι θα πετύχουμε με την
πρώτη!!!

Προσοχή!!! ΔΕΝ ξεχνάμε!

ΔΕΝ
διορθώνονται
αργότερα!!!!

Τιτλοποιούμε τα μονοκλωνικά!!!

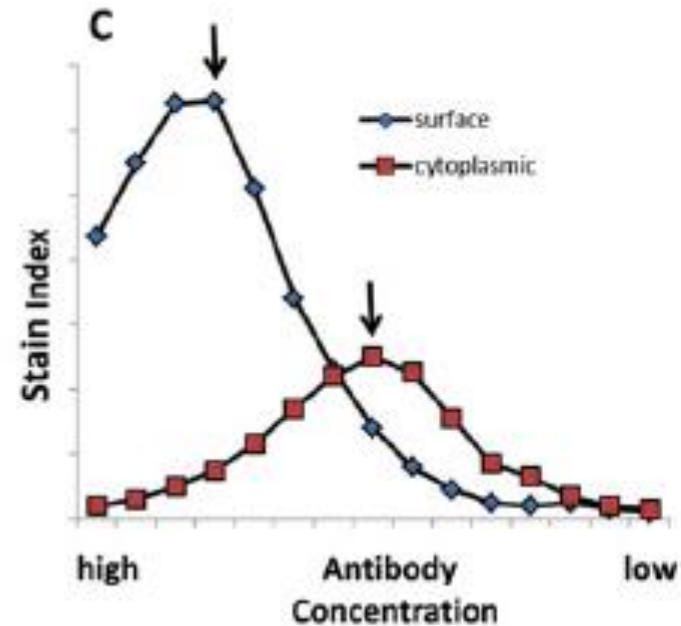
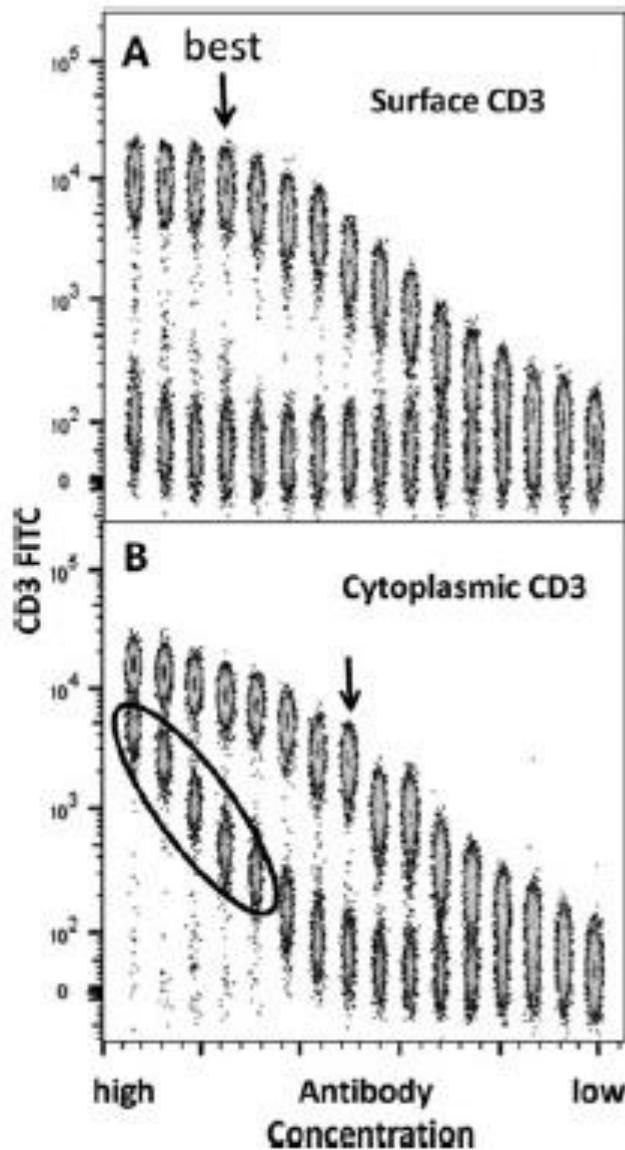
Ρυθμίζουμε PMTs και compensation!!!

Διορθώνεται
και αργότερα

Ελέγχουμε το panel με FMO (fluorescence minus one)

Ελέγχουμε control για δείκτες που δεν γνωρίζουμε

Η σημασία της τιτλοποίησης των αντισωμάτων



Maciorowski 2017

Άλλα προαναλυτικά...

Τι είδους δείγμα;;;

Για λειτουργικές δοκιμασίες: ΗΠΑΡΙΝΗ!!!

Πόσο διατηρείται;;;

Τι είδους control;;;

Ισοτυπικό;;

Αδιέγερτου δείγματος;;

Φυσιολογικού μάρτυρα;;

Χρειάζεται διέγερση;;;

Με τι (PHA, PMA, CKs;;)

Για πόσο;;

Μπορεί να
χρειάζονται
ΌΛΑ!!!

Ποιοι δείκτες μπορεί να επηρεάζονται;; (πχ. CD4 ασθενές σε
διεγερμένα T)

Άλλα προαναλυτικά...

Χρειάζεται πλύσιμο;;

Πχ. Επιφανειακές Igs!!!

(σε αμφιβολία, πλένουμε!!!)

Πόση ώρα επώαση;;

Σε τι θερμοκρασία;;;

Χαμηλότερη θερμοκρασία → Υψηλότερη ειδικότητα σύνδεσης

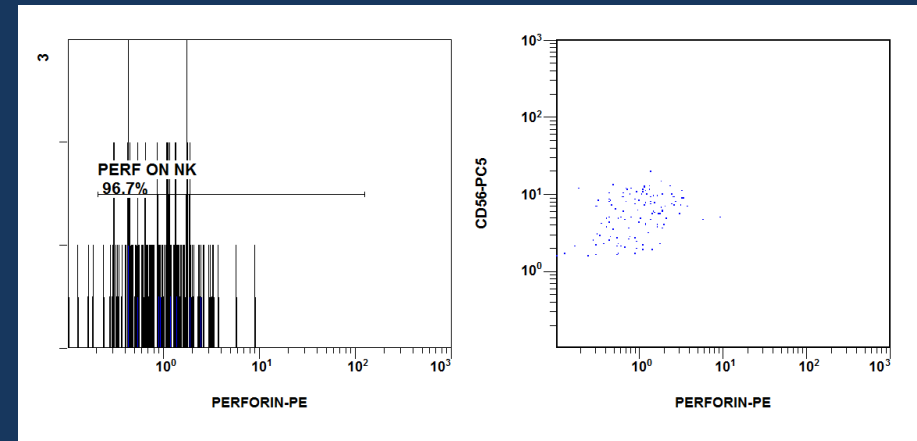
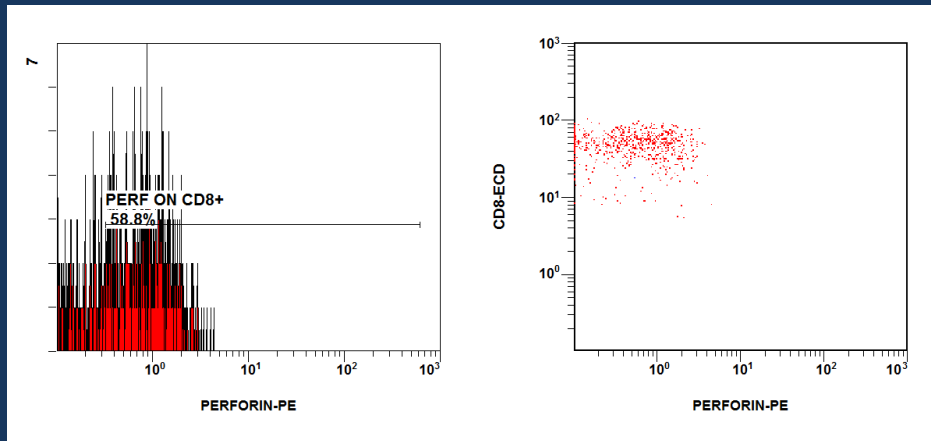
Τι είδους λύση;;;

NH_4Cl και πλύσιμο, αν δεν είμαστε σίγουροι...

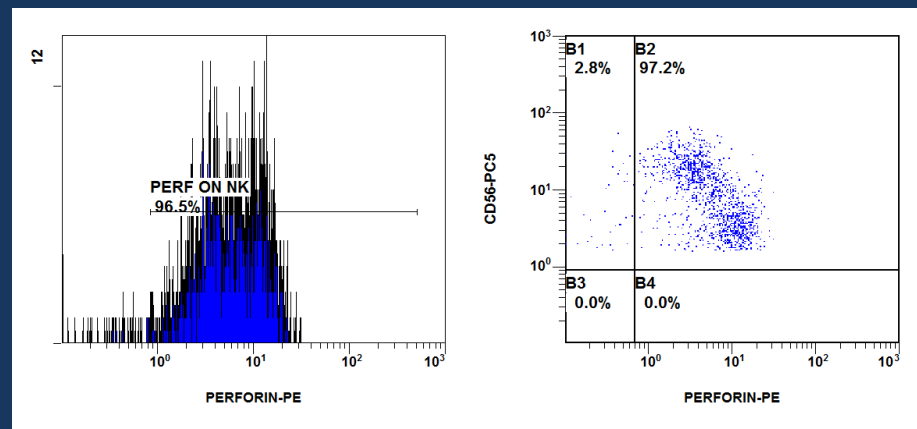
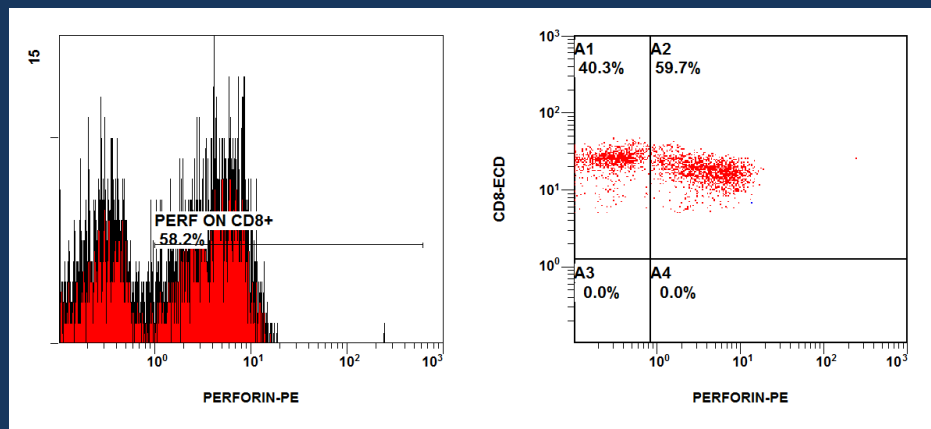
Απομόνωση με φικόλη για δύσκολους δείκτες!!!

Η διαφορά μεταξύ λύσης με NH_4Cl (δείγμα σε EDTA) (α) και απομόνωσης με φικόλη (δείγμα σε ηπαρίνη) (β)

(α)



(β)



Κατά την ανάλυση...

Στρατηγική gating...

Κάνουμε αδρή ανάλυση την ώρα που τρέχει το δείγμα
(για να μην ξεφεύγουν λάθη...)

Πόσα events;;

Σπάνιοι πληθυσμοί;;

Απλή μελέτη έκφρασης σε μεγάλο πληθυσμό;;

Τι αποτέλεσμα έχουμε;;

Περαιτέρω ανάλυση

Χρήση ειδικών software...

Basic Multicolor Flow Cytometry

Zofia Maciorowski,¹ Pratip K. Chattopadhyay,² and Paresh Jain³

¹Institut Curie, Paris, France

²Laura and Isaac Perlmutter Cancer Center, NYU-Langone Medical Center, New York, New York

³BDB Asia-Pacific, BD Life Sciences, Gurgaon, India

Multicolor flow cytometry is a rapidly evolving technology that uses multiple fluorescent markers to identify and characterize cellular subpopulations of interest, allowing rapid analysis on tens of thousands of cells per second, with the possibility of isolating pure, viable populations by cell sorting for further experimentation. This unit covers the tools needed by the beginning immunologist to plan and run multicolor experiments, with information on fluorochromes and their characteristics, spectral spillover, compensation and spread, instrument and reagent variables, and the basic elements of multicolor panel design. Protocols to quantify and maximize sensitivity by titration of reagents and optimization of instrument settings, as well as basic surface and intracellular cell staining, are included. © 2017 by John Wiley & Sons, Inc.

Keywords: flow cytometry • multicolor • fluorescent

Ευχαριστώ!!!



WHICH STEP HAVE YOU REACHED TODAY ?