



November 2016

Compensatie van de spectrale overlap, een Handreiking.

Doel

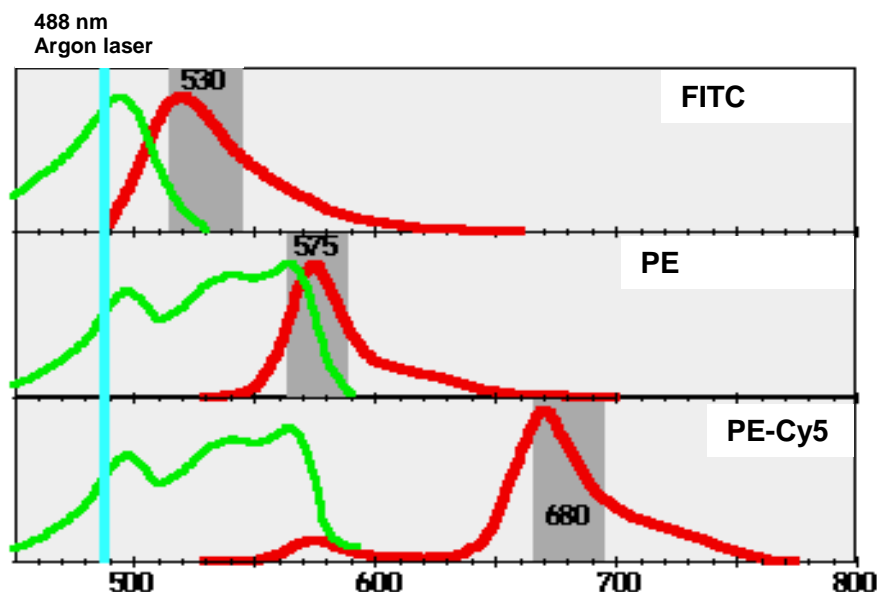
Op de juiste manier compensaties van de spectrale overlap uitvoeren.

Inleiding

Compensatie is een van de belangrijkste technische aspecten bij de flowcytometrische detectie van antigenen met behulp van meerdere MoAb-conjugaten (meer-kleuren fluorescentie). Een correcte compensatie is absoluut noodzakelijk voor een juiste weergave en interpretatie van de resultaten.

Fluorochromen hebben een excitatie- en emissiespectrum. Het excitatiespectrum is een reeks van golflengten die door een fluorochroom geabsorbeerd kunnen worden. Als gevolg hiervan stralen deze fluorochromen licht uit in een andere reeks van golflengten, het zogenaamde emissiespectrum.

In het onderstaande voorbeeld (figuur 1), zijn de excitatiespectra (in groen) en emissiespectra (in rood) van drie fluorochromen getoond: Fluoresceïne isothionaat (FITC), Phycoerythrin (PE) en PE-Cy5. Deze fluorochromen zijn geëxciteerd met licht van een argon ion laser (488 nm), in blauw weergegeven lijn. Elke van deze drie fluorochromen wordt aanzienlijk geëxciteerd door deze golflengte. Het gevolg is dat elk fluorochroom een eigen karakteristiek spectrum licht uit zendt (emissie): FITC met een maximum rond 530 nm, PE met ongeveer 575 nm en PE-Cy5 met ongeveer 680 nm.



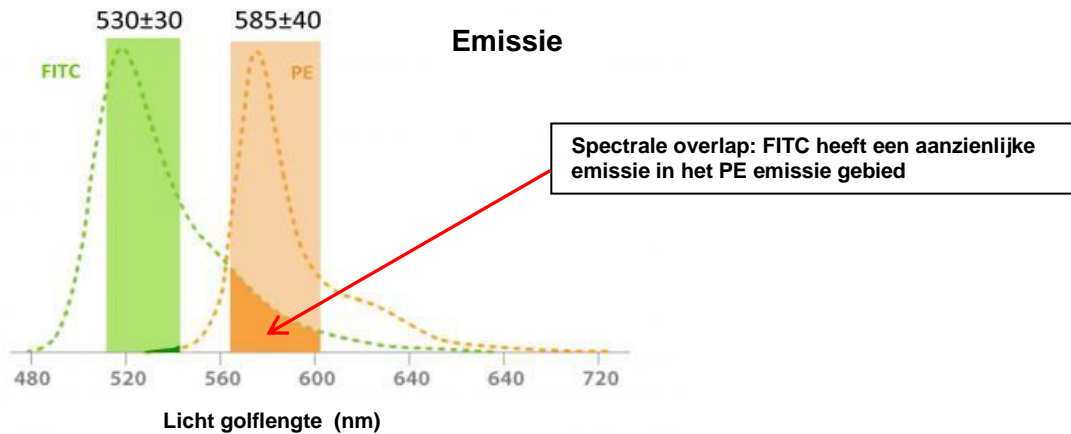
Figuur 1: Excitatie- en emissiespectra van FITC, PE en PE-Cy5 (1).

Om de maximale emissiegolflengte van deze emissiespectra te kunnen meten, wordt binnen een flowcytometer gebruik gemaakt van optische filters, zoals de “short pass” en “long pass” filters”. Deze filters laten alleen licht van een bepaald spectrum van golflengten door. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van “band pass” filters die binnen dit spectrum alleen een bepaalde bandbreedte van golflengten doorlaten, de transmissie golflengten. In het algemeen worden filters toegepast waarmee maximale golflengten van het emissiespectrum van een fluorochroom doorgelaten worden zodat spectrale overlap met emissielicht door andere fluorochromen zoveel mogelijk voorkomen wordt. Dit varieert enigszins per flowcytometer. Bijvoorbeeld voor FITC wordt, afhankelijk van het type flowcytometer, gebruik gemaakt van een “530/30” filter (FACS Canto II), d.w.z. een filter met doorlaatband gecentreerd op 530 nm met een bandbreedte van 30 nm. Deze doorlaat bandbreedte is in figuur 1 voor een aantal fluorochromen als grijs-gearceerd gebied weergegeven. In figuur 2 zijn er de specificaties van verschillende filters specifiek voor diverse fluorochromen van twee type flowcytometers (FACS Canto II en Navios) weergegeven.

	FACS Canto			Navios		
	Filter	Dye	E _{max}	Filter	Dye	E _{max}
FL1	530/30	FITC	519	525/40	FITC	519
FL2	585/42	PE	578	575/30	PE	578
FL3				620/30	ECD	615
FL4	670LP	PerCPy5.5	694	675/20	PECy5.5	694
FL5	780/60	PECy7	767	755LP	PECy7	767
FL6	660/20	APC	660	660/20	APC	660
FL7				725/20	APCA700	719
FL8	780/60	APCH7	767	755LP	APCA750	776
FL9	450/50	PacB	455	450/40	PacB	455
FL10	510/50	PacO	551	550/40	KO	528

Figuur 2. Specificaties van diverse filters van FACS Canto II en Navios flowcytometers (2).

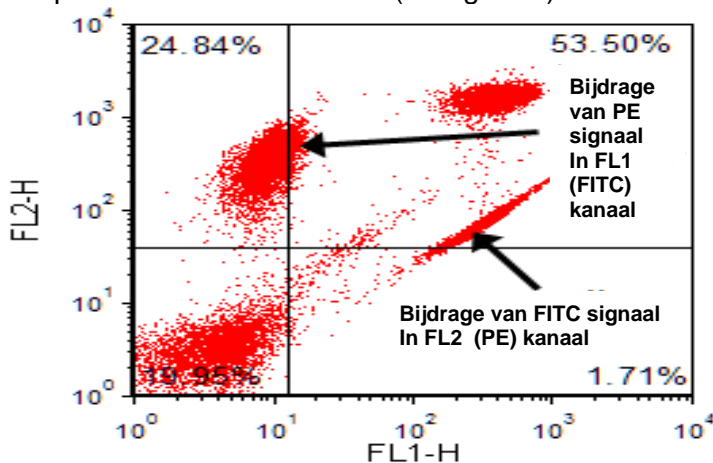
Omdat een fluorochroom niet alleen een piek maar een spectrum van licht uitzendt is het onmogelijk om de filters zo te kiezen dat alleen het emissielicht van een fluorochroom, waarvan de maximum piek valt binnen de transmissie golflengten, doorgelaten wordt. Bijvoorbeeld zoals in figuur 3 is weergegeven, heeft FITC een aanzienlijke emissie in het gebied waarin ook het PE-emissie signaal (585 nm) gemeten wordt (in oranje weergegeven). Wanneer we in een flowcytometrische bepaling een FITC fluorochroom gebruiken, zal naast het emissiespectrum in de 530 nm band ook een deel van het emissiespectrum in de 585 nm band worden gedetecteerd. Wanneer tevens een PE fluorochroom aanwezig is, zal dit, naast het FITC licht, ook bijdragen aan het totale emissiespectrum dat doorgelaten wordt door het 585 nm “band pass” filter. Op deze manier is het moeilijk om de beide emissiespectra afkomstig van FITC en PE van elkaar te scheiden. Dit wordt spectrale overlap genoemd. In dit voorbeeld is er nauwelijks een bijdrage van het PE emissiespectrum aan het licht dat naast het FITC emissiespectrum binnen de 530 nm band gedetecteerd wordt (in donker groen weergegeven).



Figuur 3: Spectrale overlap tussen FITC (FL1) en PE (FL2) fluorochromen (3).

Wat betekent dit voor de flowcytometrisch analyse?

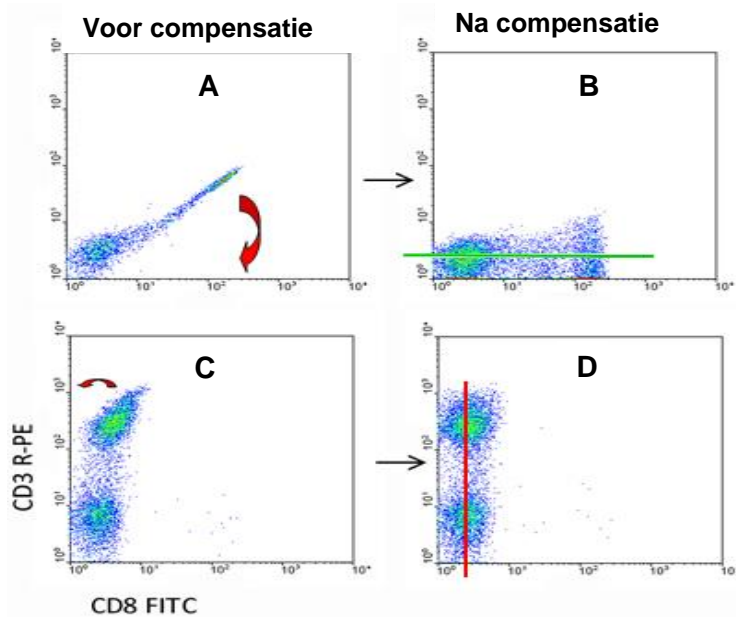
Het is duidelijk dat, wanneer de emissiespectra overlappen, dit zorgt voor een onterechte toename van het signaal in bepaalde fluorescentiekanalen, d.w.z. er kunnen fluorescenties van meerdere fluorochromen tegelijk door een detector gemeten worden resulterend in het onterecht waarnemen van dubbelfluorescentie op bepaalde cellen. Dit leidt tot een foutieve interpretatie van de resultaten (zie figuur 4).



Figuur 4: Een niet gecorrigeerd spectrale overlap tussen FITC (FL1) en PE (FL2) zorgt voor een onjuist resultaat en uiteindelijk voor een foutieve interpretatie (4). Om het fluorescentie signaal zuiver te krijgen moet deze spectrale overlap gecorrigeerd worden. Dit proces wordt compensatie genoemd.

Principe van een correcte compensatie

Een bepaling van een juiste mate van compensatie vereist dat de mediane fluorescentie van de gekleurde populatie in elk ander kanaal (behalve het specifieke kanaal voor die kleur) gelijk is aan de gemiddelde fluorescentie van een ongekleurde populatie in dezelfde kanalen (zie figuur 5). Bijvoorbeeld, wanneer de compensatie correct is uitgevoerd hebben FITC-positieve cellen dezelfde mediane PE fluorescentie als FITC-negatieve cellen (groene lijn in figuur 5B), en ook PE-positieve cellen dezelfde mediane FITC fluorescentie als PE-negatieve cellen (rode lijn in figuur 5D). Multi-kleuren compensatie is een uitbreiding van deze twee-kleuren compensatie.



Figuur 5: Compensatie voor de FITC en PE fluorescentiesignalen in respectievelijk PE en FITC kanalen.

A-B: ongecompenseerd (**A**) en correct gecompenseerd (**B**) voor het FITC emissiespectrum in PE Kanaal.

C-D: ongecompenseerd (**C**) en correct gecompenseerd (**D**) voor het PE emissiespectrum in FITC kanaal.

De praktijk

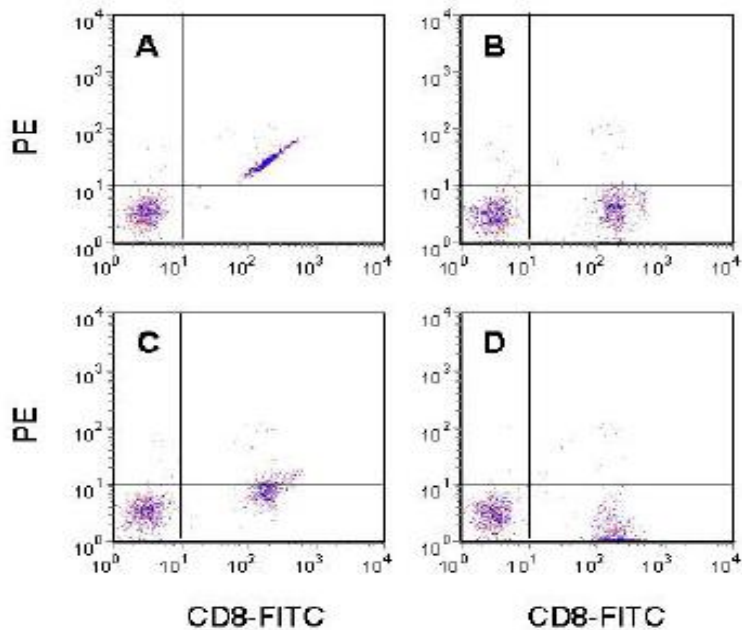
In figuur 6 is een praktijkvoorbeeld weergegeven voor het corrigeren (compensatie) van het FITC-fluorescentielicht in het kanaal waarin het PE-emissiespectrum gedetecteerd wordt. Op die wijze kunnen we de hoeveelheid fluorescentiesignaal afkomstig van PE fluorochroom goed bepalen. In figuur 6 zijn er verschillende situaties weergegeven van geen, correcte compensatie, onder-, en overcompensatie van het FITC emissielicht in het PE kanaal.

In figuur 6A is het ongecompenseerde situatie weergegeven: de dubbel negatieve populatie (links-onder kwadrant), en een populatie in een rechte lijn (rechts-boven kwadrant). Dit wordt veroorzaakt door de spectrale overlap van het ene fluorochroom (in dit geval FITC) in het andere (PE) kanaal.

Figuur 6B toont de correcte compensatie: er is geen spectrale overlap van het FITC emissielicht in het PE kanaal. Dit blijkt uit het feit dat de PE negatieve cellen allemaal in het rechter onderkwadrant liggen.

Figuur 6C toont ondercompensatie: de FITC positieve, PE negatieve populatie ligt "te hoog". Het centrum van deze populatie ligt ruim boven het centrum van de dubbel negatieve populatie.

Figuur 6D: overcompensatie: De FITC positieve, PE negatieve events liggen "te laag": het centrum van deze populatie ligt ruim onder het centrum van de dubbel negatieve populatie.



Figuur 6: Compensatie van het CD8 FITC fluorescentiesignaal in het PE kanaal (6).
A: ongecompenseerd, **B:** correct gecompenseerd, **C:** ondergecompenseerd,
D: Overgecompenseerd

Algemene richtlijnen voor het bepalen en instellen van compensatie

De procedure voor de instelling van een juiste compensatie is in wezen voor elke flowcytometer vergelijkbaar. Er zijn echter verschillen tussen de beschikbare flowcytometers. Dit maakt het lastig om een protocol voor alle instrumenten te maken. Compensatie kan zowel manueel als via software-wizards ingesteld worden. Voor een gedetailleerde richtlijn moet men de handleiding van de fabrikant van de eigen flowcytometer raadplegen. In principe zijn in de meeste gevallen de volgende richtlijnen geschikt om compensatie goed in te stellen.

- 1- Met behulp van kalibratie beads moet de optiek en het flow-systeem van de flowcytometer gecontroleerd en eventueel bijgesteld worden zodat instellingen binnen het specificatie bereik vallen.
 Stel de PMT voltages (zie richtlijn instellingen flowcytometrie) in voor elk kanaal m.b.v. ongelabelde cellen. De PMT voltages moeten zo ingesteld worden dat de negatieve populatie in elk kanaal net losliggen van de as en de signaal/ruis verhouding maximaal is. De voorwaartse (forward) en zijwaartse (side) lichtverstrooiing (scatters) moeten dusdanig ingesteld zijn dat alle celpopulaties duidelijk herkenbaar in beeld komen. Dode cellen, aggregaten en debris moeten geëxcludeerd worden zodat een zuivere analyse kan plaatsvinden.
- 2- Bij het instellen van compensatie dient in principe elke buis voor een fluorescentielabel ongelabelde en gelabelde (enkel-kleur) cellen te bevatten. Hiermee worden de positieve (minimaal 10% van de populatie) en negatieve cel populaties door het afstemmen van de mediaan fluorescenties uitgelijnd. Hiervoor kan men de ongekleurde cellen aan de gekleurde cellen toevoegen.
- 3- Indien perifeer bloed geanalyseerd wordt kunnen cellen geïncubeerd met CD8 (gelabeld met de diverse fluorochromen) gebruikt worden voor het instellen van de compensatie. CD8 bindt aan een antigeen dat sterk tot expressie komt op T-cellen en geeft daardoor een hoge fluorescentie intensiteit zodat ook cellen die CD8-negatieve

of CD8-dim expressie hebben gedetecteerd kunnen worden. Hiervoor moeten de cellen in separate buizen met verschillende anti-CD8 conjugaten worden gekleurd zodat de compensatie per fluorescentielicht ingesteld kan worden.

- 4- In de compensatie buis moeten de gelabelde (positieve) cellen dezelfde autofluorescentie (wanneer ze niet gelabeld zijn) hebben als de ongelabelde (negatieve) cellen, d.w.z. hiervoor moet hetzelfde type cel gebruikt worden, bijvoorbeeld lymfocyten.
- 5- Voor de compensatie instelling van elk fluorescentiekanaal moet een fluorochroom gebruikt worden dat een hoge intensiteit heeft. Bij een correcte compensatie instelling zal daarmee in de meeste gevallen ook een juiste compensatie verkregen worden voor een minder intense fluorochroom.
- 6- Een analyse gate moet zo gezet worden dat alleen de cellen met identieke autofluorescentie karakteristieken voor compensatie gebruikt worden.
- 7- Een analyse gate moet zowel negatieve als positieve cellen bevatten.
- 8- Als een vuistregel begint men bij het instellen van compensatie met de fluorochromen die een ver-rood (far-red) spectrum (hogere golflengte) hebben. Vervolgens wordt de compensatie stapsgewijs omlaag voortgezet naar de fluorochromen met een lager spectrum (lagere golflengte).
- 9- Na het instellen van de compensatie moet deze setting in alle kanalen gecontroleerd worden voor de juiste compensaties van een multi-kleuren panel van MoAbs

Berekening van de compensatiewaarden

Om voor de overlap te corrigeren, moet de waarde van de spectrale overlap voor alle fluorochromen in alle detectoren (PMT's) door gelabelde (enkel-kleur) cellen worden gemeten. Vervolgens worden de spectrale waarden in een matrix gezet waaruit de compensatiewaarden worden berekend. Uiteindelijk worden dus de compensatiewaarden (en niet de spectrale overlap waarden) door de flow cytometer gebruikt om de bijdrage van andere kleuren (overlap) aan een bepaalde detector (PMT) te corrigeren.

Aandachtspunten

Van belang is dat de mate van spectrale overlap niet alleen afhankelijk is van de karakteristieken van de emissiespectra van verschillende typen van fluorochromen, maar ook van de specificaties van de filters en de detectoren in de flowcytometer. Verder moet er voor een juiste compensatie ook aandacht zijn voor de volgende punten:

- Bij een veranderde stand van de detectoren (PMT setting) moet er opnieuw gecompenseerd worden.
- Juiste titratie van MoAbs
- Tandem-fluorochromen zijn door de variatie in chemische koppeling lastiger te compenseren. Daarom moeten zij per nieuwe batch gecompenseerd worden.
- Aandacht voor autofluorescentie wanneer niet dezelfde type cel bij compensatie gebruikt wordt (plasmacellen hebben meer autofluorescentie dan lymfocyten).
- Iedere celbron (bloed, beenmerg, BAL) heeft een eigen compensatie instelling nodig
- Hoewel de meeste overlap aan de hogere golflengtekant van de emissiepiek zal plaatsvinden, kan er door de *vorm* van de spectrale emissiecurve ook enige overlap plaatsvinden met het tegengestelde einde (lagere golflengtekant van emissiepiek). Naar mate er meer fluorochromen in een panel gebruikt gaan worden, kan dit tot een probleem leiden. Want als er een brede range van fluorescentie-intensiteiten in de

negatieve populaties aanwezig is, kan dit een goede compensatie lastig maken en hier zal de sensitiviteit onder lijden.

- Er dient rekening gehouden te worden dat a. een ander MoAb gelabeld met hetzelfde fluorochroom een andere compensatie stand nodig kan hebben, b. dat conjugaten van verschillende leveranciers verschillen in conjugatie-proces en labellings-index waardoor aanpassing van de compensatie noodzakelijk is.
- Sommige tandem conjugaten kunnen aangestraald worden door twee lasers (bijv. PECy5) waardoor de emissiespectra verbreed worden en extra compensatie nodig is ten opzichte van de compensatie instelling bij gebruik van een enkele laser.
- Er dient rekening gehouden te worden dat naast compensatie ook spill over een rol speelt bij het uiteindelijke signaal (combinatie van voltage, celtype en het fluorochroom). Spill over veroorzaakt verminderde gevoeligheid. Het verlagen van de compensatie verandert de spill over niet en spill over is populatie afhankelijk. Naast een goede compensatie instelling is het dus van belang om de juiste positie voor een MoAb in het panel te kiezen.

Literatuur

- Roederer M. Compensation in Flow Cytometry. Curr Protec Cytom. 2002
- Michael G Ormerod. Flow Cytometry - A Basic Introduction. 2008
- Loken M, Parks DR, Herzenberg LA. Two-color immunofluorescence using a fluorescence-activated cell sorter. *J. Histochem. Cytochem.* 1977;25:899-907.
- Alberti S, Parks DR, Herzenberg LA. A single laser method for subtraction of cell autofluorescence in flow cytometry. *Cytometry.* 1987;8:114-119.
- Bagwell CB, Adams EG. Fluorescence spectral overlap compensation for any number of flow cytometry parameters. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1993;677:167-184.
- Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia.* 2012;26:1986-2010
- Tanqri S, Vall H, Kaplan D, et al. Validation of Cell-based Fluorescence Assays: Practice Guidelines from the ICSH and ICCS– Part III – Analytical Issues. *Cytometry B;*84:291-308.

Bron plaatjes:

- 1- <http://www.drmmr.com/compensation/WhatIs.html#anchor41319361>
- 2- Preijers F, Huys E, Moshaver B. *Cytometry A.* 2012;81:453-455.
- 3- <http://www.lifesci.dundee.ac.uk/cast/flow-cytometry-core-facility/techniques>
- 4- <https://www.denovosoftware.com/site/compensationdetails.shtml>
- 5- https://www.proimmune.com/ecommerce/page.php?page=technical_support
- 6- http://flowbook.denovosoftware.com/Flow_Book/Chapter_5%3A_Immunofluorescence_and_Colour_Compensation.