



Kalibratie flowcytometer met behulp van PMT settings, een handreiking

1. Doel

Dit document heeft als doel een handreiking te geven voor het vaststellen van de optimale voltages op de fotomultiplier tubes (PMTs), de zgn. PMT settings. Hierbij zullen de verschillende methoden van aanpak besproken worden en tevens de methode voor synchronisatie van de verschillende flowcytometers. Daarnaast worden er aanbevelingen gegeven voor het monitoren van deze settings; kwaliteitscontrole.

2. Inleiding

Flowcytometers (FCM's) zijn instrumenten die gelijktijdig de verstrooiing van licht door verschillende celtypen en de emissie als gevolg van fluorescentie van verschillende aan monoklonale antilichamen (MoAbs) gebonden fluorochromen kunnen meten. Voor een optimale analyse, is het nodig te zorgen voor de adequate instelling van de instrumentcondities, waaronder het afstellen van de lichtverstrooiing en de fluorescentie detectoren alvorens er specifieke metingen verricht kunnen worden.

Kalibratie van het fluorescentie signaal zorgt ervoor dat het fluorescentie signaal stabiel en reproduceerbaar is. Dit is noodzakelijk omdat de intensiteit van het fluorescentiesignaal gebruikt wordt om te discrimineren tussen positieve en negatieve cel populaties. Daarnaast moet de fluorescentie intensiteit van een bepaald conjugaat altijd gelijk zijn zodat de vervolg resultaten van een patiënt vergelijkbaar zijn.

Kalibratie houdt in dat voor iedere PMT het optimale voltage wordt vastgesteld waardoor zwak fluorescerende cellen onderscheiden worden van cellen die het bepaalde conjugaat niet binden met een minimale bijdrage van elektronische ruis. Elektronische ruis wordt met name veroorzaakt door de elektronica, opgevangen strooilicht door de optica, fluorescentie van ongebonden fluorochroom, reagentia, en vervuilingen in vloeistof of monster.

Kalibratie frequentie is afhankelijk van de stabiliteit van de apparatuur maar dient in ieder geval plaats te vinden wanneer het controle materiaal niet binnen het gestelde criterium valt en er onderhoud aan de optiek heeft plaatsgevonden.

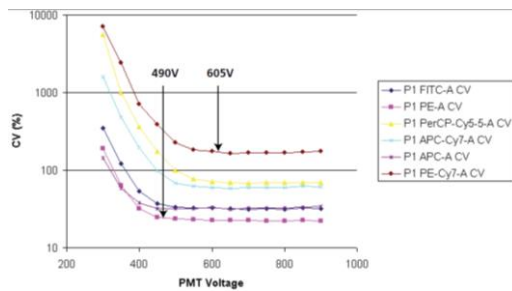
3. Optimale PMT voltages

3.1 Methoden voor optimale PMT instellingen

Voor het instellen van de optimale PMT instelling dient men één van de volgende methoden te gebruiken: 1) Robuust SD/VC meten voor standaard gekleurde beads (bolletjes) of 2) Signaal/Ruis verhouding meten voor gekleurde cellen of beads.

3.1.1 Robuust SD/VC meten voor standaard gekleurde beads

De robuust SD of VC ($rVC = \sqrt{VC^2 - VC_{led}^2}$) van zwak fluorescerende beads (vergelijkbaar met zwak fluorescerende cellen) wordt gemeten bij verschillende PMTs. Het inflectie punt van de curve kan beschouwd worden als de minimale voltage voor optimale resolutie gevoeligheid (Figuur 1).



Figuur 1 Relatie tussen de rCV en PMT voltage voor verschillende fluorochromen. Het inflectie punt (pijl) van de curve is de waarde van de PMT voor optimale resolutie gevoeligheid.

Keuze van de beads voor het meten van de robuust SD/CV

Commerciële beads zijn verkrijgbaar die gekleurd zijn met een set van meerdere gangbare kleuren in verschillende sterkten. Deze beads moeten qua grootte vergelijkbaar zijn met de te meten cellen en stabiel (om drifting te voorkomen) en lang houdbaar zijn. Type IIA en IIB beads voldoen hieraan:

- **IIA-beads**
Hebben een interne of “hard-dyed” kleuring, m.a.w. in the bead zit een stabiele fluorescerende stof die met behulp van de flowcytometer gedetecteerd kan worden. Type IIA beads zijn relatief stabiel (> 1 jaar) maar matchen niet met het spectrum, omdat de fluorescerende stof een andere is dan de gebruikelijke fluorochromen.
- **IIB-beads**
Zijn extern gelabeld met dezelfde fluorochromen als gebruikt worden voor de immunofenotypering. Type IIB beads zijn 3-6 maanden stabiel en matchen met het spectrum, ze zijn immers hetzelfde. Voor het vergelijken van verschillende apparaten hebben type IIB beads de voorkeur (zie paragraaf 3.2).

De commerciële sets die beschikbaar zijn kunnen toegepast worden in combinatie met specifieke software, die geautomatiseerd het proces van kalibratie en controle van de PMTs mogelijk maakt. Door middel van Levey-Jennings plots is het vervolgens mogelijk het verloop van de PMT's van dag tot dag te monitoren (zie ook hoofdstuk 4).

Deze methode is 1) eenvoudig uit te voeren, 2) relatief goedkoop en 3) gestandaardiseerd en is daardoor bruikbaar voor dagelijkse kwaliteitscontrole.

Voorbeelden van commerciële beads (Mittag and Tárnok, 2009)

Common beads suitable for calibration and standardization in cytometry. Examples of calibration particles and their main application (other applications may also be possible) are listed for different purposes in cytometry. (1 Thermo Fisher Scientific Inc., 2 Spherotech, Inc., 3 Beckman Coulter, Inc., 4 BD Biosciences, 5 Bangs Laboratories, Inc., 6 Dako, 7 Partec GmbH, 8 Polysciences, Inc., 9 Invitrogen Corp.).		
	Purpose	Brand
Fluorescence	Fluorescence standardization, calibration, quality control	Calibration Beads ⁷ CaliBRITE™ Beads ⁴ Cyto-Cal™ Low Intensity Calibrator ¹ Cyto-Cal™ Multifluor Fluorescence Intensity Calibrator ¹ Flow-Set™ Fluorospheres ³ FluorSpheres 6-peak ⁶ IMMUNO-BRITE™ ³ LinearFlow™ ⁹ Sphero™ Rainbow Calibration Particles ²
	Compensation	AbC™ anti-Mouse Bead Kits CYTO-COMP™ ³ FACSTM 7-Color Setup Beads ⁴

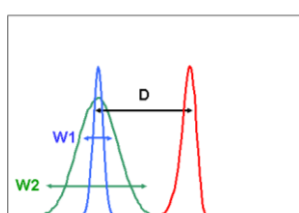


		FITC/PE Compensation Standards ⁵ Flow Check ¹ Color Compensation Sets Simply Cellular ¹ Compensation Standard TM ⁵ Sphero TM COMPtol ² Sphero TM EasyComp ²
	Determination of Molecules of equivalent soluble fluorescence (MESF)/Antibody Binding Capacity (ABC)	QIFIKIT ¹⁶ QuantiBRITE TM Beads ⁴ Quantum TM MESF Kits ⁵ Quantum TM Simply Cellular ¹⁵
sample	Control of sample preparation	CYTO-TROL TM Control Cells, IMMUNO-TROL TM Cells, Stem-Trol TM Control Cells ³ LeucoCOUNT Control ⁴ Multi-CheckControl ⁴ Stem Cell Controls, Retic-COUNT Control TM 4
non-fluorescence	Absolute cell counting	CountBright TM Absolute Counting Beads ⁹ CountCheck ⁷ Cyto-Cal TM Count Control ¹ CytoCount TM 6 Flow Cytometry Absolute Count Standard TM 5 Flow-Count TM Fluorospheres ³ Sphero TM AccuCount Particles ² TruCOUNT TM Control beads ⁴
	Size calibration	Nanobead (Microbead; Macrobead) NIST Traceable Particle Size Standards ⁸ Size Calibration Standards Kits ⁵
functionality	Further (functional) calibration	AlignFlow TM flow cytometry alignment beads ⁹ Cyto-Cal TM Alignment Standard ¹ FACS TM Accudrop Beads ⁴ Flow-Check TM Fluorospheres ³ Sphero TM Drop Delay Calibration Particles ² Sphero TM Rainbow Alignment Particles ²

3.1.2 Signaal/Ruis verhouding meten voor gekleurde cellen of beads

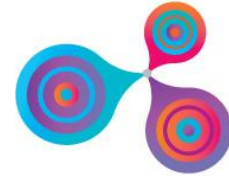
De signaal-ruis verhouding kan berekend worden door de gemiddelde fluorescentie intensiteit van de positieve populatie te delen door die van de negatieve (alleen auto-fluorescentie) populatie. Een alternatief is het verschil van de gemiddelde fluorescentie van de positieve en negatieve populatie te delen door de samengevoegde SD van beide populaties of de SD van de negatieve populatie (hierdoor houd je rekening met spreiding van de negatieve en positieve populatie), zie figuur 2. De bijdrage van elektronische ruis is mede afhankelijk van de mate van fluorescentie als gevolg van de aviditeit en concentratie van het monoklonale antilichaam en de fluorescentie-eiwit verhouding.

Resolution Sensitivity:



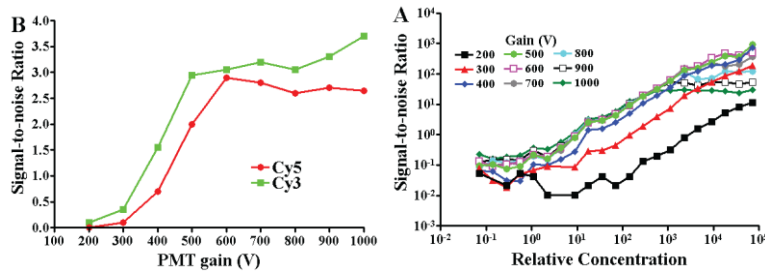
$$\text{Stain Index} = D / W$$

Where D = difference between positive and negative peak medians, and
W = $2 \times \text{rSD}$ (robust standard deviation)



Figuur 2 Mogelijke wijze van berekening signaal/ruis verhouding (stain index).

In de praktijk betekent dit dat de optimale PMT vastgesteld kan worden bij een gemiddelde antilichaam concentratie (in het geval van onderstaand figuur 3B is de optimale PMT rond de 500V). Waarnaar bij verschillende concentraties fluorochroom (titratie) en PMT's de signaal-ruis verhouding gemeten wordt (zie figuur 3A, waarbij in dit geval te zien is dat boven de 500V de detectielimiet gelijk is).



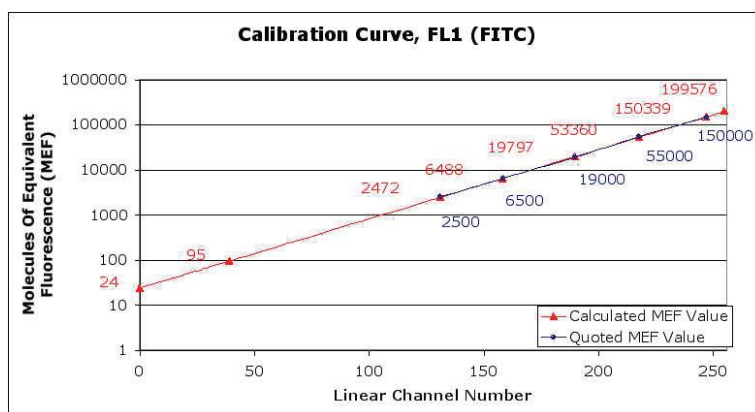
Figuur 3 B) Relatie tussen PMT en signaal/ruis verhouding voor fluorochroom Cy5 en Cy3 A) Relatie tussen concentratie fluorochroom (x-as) en signaal/ruis verhouding bij verschillende PMT's (200-1000V).

Voordeel van deze methode is dat dit kan worden toegepast op specifieke cel populaties of monsters en voor ieder specifiek te gebruiken monokonaal. Nadelen zijn: 1) moeilijk te standaardiseren, 2) arbeidsintensief en 3) kostbaar. Deze methode kan noodzakelijk zijn wanneer commerciële beads niet beschikbaar zijn voor de specifieke (cel)analyse.

Voor het bepalen van de ruis kan ook een non-fluorescerende bead (type 0) gebruikt worden. De combinatie van een Type 0 en een type IIA bead kan dan gebruikt worden als parameter voor de instrumentgevoeligheid voor fluorescentiesignalen.

3.1.3 Lineariteit

Ook de lineariteit van het fluorescentie signaal moet gecontroleerd worden. Hiervoor kunne type III beads gebruikt worden. Deze bestaan uit een serie beads met verschillende gedefinieerde fluorescentie intensiteiten (minimaal 4 fluorescente beads en 1 non-fluorescente (type 0) bead). De fluorescentie intensiteiten moeten het deel van de schaal met een lineaire respons van het signaal in de 2e 3e en het linker deel van de 4e log decade dekken. Lineariteit dient 1 keer per week gecontroleerd te worden. Overigens geldt voor een aantal nieuwere flowcytometers /software dat de lineariteit automatisch wordt gemeten en gecontroleerd.



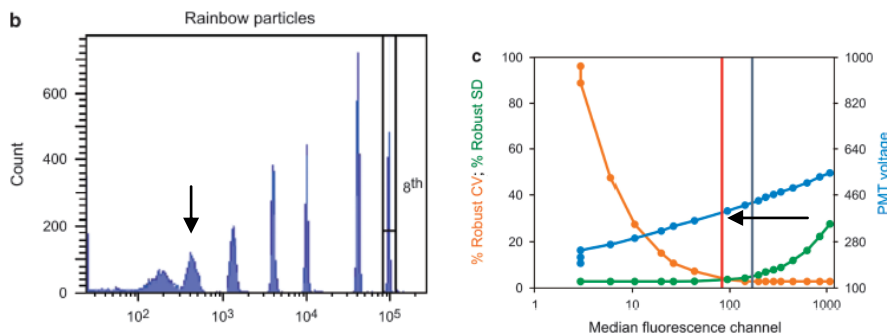
Figuur 4 Controle lineariteit.



3.2 Synchronisatie meerdere flowcytometers

Euroflow heeft een procedure opgesteld voor het op elkaar afstemmen van meerdere flowcytometers in verband met bijvoorbeeld een multicenter studie.

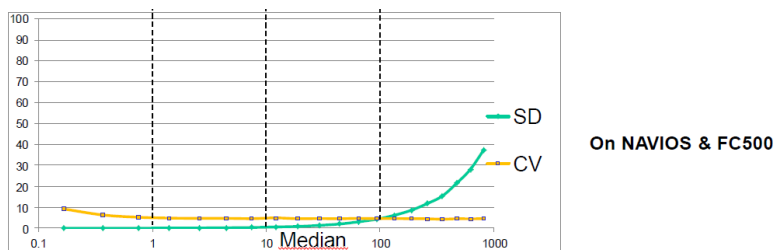
Op 1 instrument wordt met het 2^e zwak fluorescerende bead van de *Rainbow 8-peak beads* een curve gemaakt van robuust CV tegen mediane fluorescentie bij oplopende PMT voltage (stappen van 50V). De optimale voltage voor ieder kanaal wordt gezet op het begin van de plateau fase van de CV curve. Vervolgens wordt op dit voltage met de sterkst fluorescerende bead de MFI's bepaald van alle kanalen. Deze MFI's worden gebruikt als target waarden voor alle andere flowcytometers.



Figuur 5 A) Fluorescentie intensiteiten van Rainbow 8-peak beads. Pijl geeft de 2^e zwak fluorescerende bead aan. B) Relatie tussen fluorescentie kanaal, robuust CV/SD en PMT voltage. Pijl geeft de te gebruiken optimale PMT voltage aan voor alle kanalen.

Daarna wordt op alle andere flowcytometers de rCV versus PMT gemeten. PMT settings worden aangepast zodat target MFI's bereikt worden, echter de PMT moet wel op de plateau fase van de rCV curve zitten. Vervolgens kunnen alle sterk fluorescerende markers van het te testen panel gemeten worden en vindt controle plaats van de target MFI. Indien target MFI's niet bereikt kunnen worden bij PMT's in de plateau fase van de rCV curve worden de target MFI's aangepast.

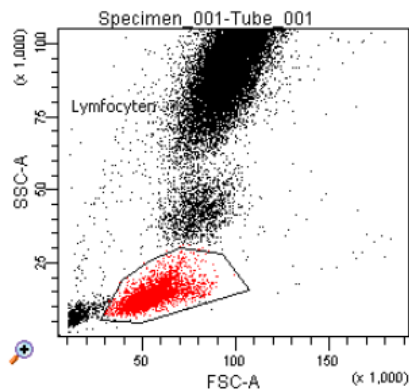
Voor de Navios en FC 500 apparaten van Beckman is gebleken dat dit probleem in veel mindere mate speelt. Deze apparaten hebben een goede lineariteit en log schaal op elk PMT voltage (oranje lijn in onderstaande figuur loopt dan laag en zo goed als vlak). Dezelfde piek CV wordt gevonden in alle 4 log decades en heeft hiermee een 4 log decades dynamisch bereik. Hiermee is er geen noodzaak om het optimum PMT voltage te bepalen voor gebruik.



Figuur 6 Relatie tussen fluorescentie kanaal en robuust CV/SD op Navios en FC500 flowcytometers.

3.3 PMT FSC en SSC

Instelling van de FSC (celgrootte) en SSC (granulariteit) PMT vindt plaats door alle te verwachten celpopulaties zichtbaar te maken in de FSC en SSC plot. De FSC wordt daarnaast zo bijgesteld dat het meeste debris, luchtbellen en elektronische ruis worden verwijderd van de analyse.



Tube Name: Tube_001
Record Date: May 14, 2012 11:04:39 AM

Population	FSC-A Mean
■ Lymfocyten	55,255

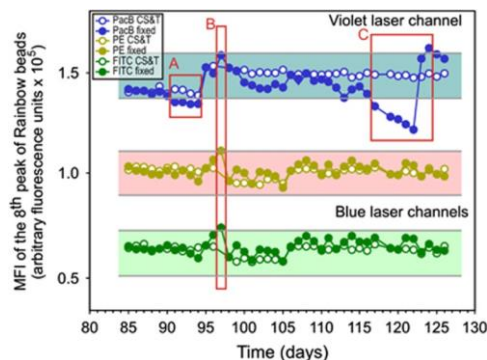
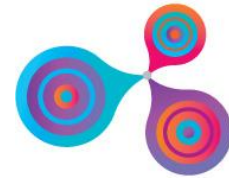
Tube Name: Tube_001
Record Date: May 14, 2012 11:04:39 AM

Population	SSC-A Mean
■ Lymfocyten	13,186

Figuur 7 Vaststellen FSC en SSC waarden.

4. Monitoring van instrument settings/kwaliteitscontrole

Na elke koude start dient een controle van de instrument settings plaats te vinden. Nadat de laser gestabiliseerd is kan met controle beads (fluorescentie-intensiteit in midden van meetbereik) gecontroleerd worden of de fluorescentiepieken nog de vastgestelde MFI's hebben. Hierbij kan uitgegaan worden van een gelijkblijvende waarde en de PMT settings en compensatie (wanneer pas je de compensatie aan, verwijzen naar stuk over compensaties) aangepast worden. De grote fabrikanten hebben reagens en software voor dit doel (zie bijlage). Ook kan gekozen worden voor een targetrange. Hiervoor worden met behulp van de Westgard regels tolerantiezones vastgesteld en worden de waardes uitgezet in Levey-Jenningsplots. In de Euroflow studie zijn de volgende criteria gebruikt: 1. De MFI's vallen in de targetrange van $MFI \pm 15\%$; 2. De CV van de sterkste piek is $< 4\%$ voor de blauwe en violette laser en $< 6\%$ voor de rode laser en het PECy7 kanaal. Als de instrument setting niet goed is kan met aanvullende maatregelen zoals bv. een uitgebreide spoelprocedure, het ontluchten van de flowcel, en verificatie van de laser gekeken worden of de meting de criteria haalt en anders dient een technische dienst ingeschakeld te worden.



Figuur 8 Voorbeeld van de weergave van de weergave van de stabiliteit gedurende een bepaalde periode van de Rainbowbeads uitgezet in een Levey-Jennings plot. In box A en C worden de grenzen overschreden en acties uitgezet. B is na onderhoud.

Naast de hierboven genoemde sets van beads om de PMT instellingen te optimaliseren en te controleren is er een controle materiaal in de handel, waar in gestabiliseerd vol bloed de meeste in de dagelijkse flowcytometrie gangbare CD markers in een gedefinieerd percentage aanwezig zijn (BMD, CD-Chex Plus). Dit materiaal moet gelijk aan een patiënten materiaal behandeld worden en zou bv. eenmaal per week meegenomen kunnen worden.

Als externe controles zijn de SKML en EQAS programma's beschikbaar.

Literatuur

Kalina et al. Euroflow standardization of flow cytometer protocols Leukemia 2012; 26; 1986-2010.

Kraan J, Gratama JW, Keeney M, D'Hautcourt. Setting up and calibration of a flow cytometer for multicolor immunophenotyping. J Biol Regul Homeost Agents 2003; 17: 223-33.

Maecker HT, Trotter J. Flow cytometer controls, instrument setup, and the determination of positivity. Cytometry 2006 Part A 69A; 1037-42.

Mittag A, Tárnok A. Basics of standardization and calibration in cytometry. J. Biophoton 2009; 2, 470-81.

Perfetto SP, Ambrozak D, Nguyen R, Chattopadhyay P, Roederer M. Quality assurance for polychromatic flow cytometry. Nature Protocols 2006, 1, 1522-30.

Wood B. 9-color and 10-color flow cytometry in the clinical laboratory. Arch Pathol Lab Med 2006; 130: 680-90.



Bijlage 1

Interne QC flowcytometers

Aanbevelingen firma's

Beckman Coulter: Flow-Check Pro en Flow-Set Pro tussen 1 maal per week tot dagelijks.
Flow-Check Pro is met name bedoeld voor een controle op de uitlijning van de lasers.
Flow-Set Pro is bedoeld om de apparaat settings te controleren

BD: BD adviseert dat er dagelijks een performance check gedraaid moet worden met behulp van de CS&T beads. Deze module zal de voltages ook automatisch aanpassen naar de target values, zodat een gelijke expressie wordt behouden en de experimenten in de tijd vergelijkbaar zijn. De CS&T beads zijn alleen te gebruiken in combinatie met de FACSDiva software. De FACSCanto software kan alleen gebruik maken van de 7-color beads.

Beide firma's hebben software, waarin de resultaten in Levey-Jennings plots wordt bijgehouden.