

Titratie van een MoAb conjugaat, een handreiking

1. Inleiding

De fluorescentie-intensiteit van de gekleurde cel is evenredig met de hoeveelheid gebonden monoklonale antistof (MoAb) op de cel*. Dit betekent dat de hoeveelheid MoAb niet beperkend mag zijn en dus niet beïnvloed mag worden door het aantal cellen dat aanwezig is. Andersom is zuinigheid geboden bij gebruik van kostbare MoAb conjugaten en moet specifieke kleuring van cellen zoveel mogelijk beperkt worden, zodat er een optimaal onderscheid gemaakt wordt tussen positieve en negatieve cellen.

Commercieel verkrijgbare MoAb conjugaten worden geleverd in uiteenlopende concentraties. Bij geconjugeerde MoAb is het aantal moleculen fluorochroom gebonden per antilichaam-molecuul (F/P ratio) veelal wisselend tussen diverse producten en zelfs tussen batches (afhankelijk van de leverancier) van één product. Dit maakt het bepalen van een optimale gebruikstiter bij ingebruikname van een MoAb voor immunofluorescentie testen noodzakelijk.

Met een titratie worden de volgende variabelen gecontroleerd en zonodig wordt de gebruiksverduunning aangepast:

- Wisselende concentratie
- Wisselende affiniteit
- Wisselende specificiteit
- Wisselende Ag dichtheid
- Binnen MoAb-producten wisselende F/P ratio

* Met lage affiniteit/aviditeit MoAbs is volledige verzadiging wellicht niet mogelijk tijdens een kleuring in korte tijd. Gebruik van dergelijke MoAbs maakt conclusies over relatieve intensiteiten moeilijk. Het gebruik hiervan is dan ook af te raden.

2. Aanpak

2.1 Titratie van een MoAb conjugaat

Middels een titratiecurve kan de optimale concentratie van het MoAb conjugaat bepaald worden zodat er een verzadigende hoeveelheid MoAb aanwezig is en er een optimale signaal/ruis verhouding wordt verkregen.

Een mogelijke benadering hiervoor is dat er 1:2 verdunningen gemaakt worden van de hoeveelheid MoAb dat door de fabrikant wordt voorgesteld. Bv. in geval dat er geadviseerd wordt 5µl MoAb toe te voegen aan 150µl leukocyten suspensie, kan er een volgend titratieschema gebruikt worden:

- | | | |
|----|--------|---------------|
| 1) | 0 µl | (Controle) |
| 2) | 2,5 µl | (Titer 1:60) |
| 3) | 5 µl | (Titer 1:30) |
| 4) | 10 µl | (Titer 1:15) |
| 5) | 20 µl | (Titer 1:7,5) |

Voer het kleuringprotocol/lyseerprotocol uit dat gebruikt wordt in het eigen laboratorium (met gebruik van een praktisch haalbare tijd voor de kleuring). Zorg ervoor dat het eindvolume (celsuspensie + MoAb) altijd constant is, vul zonodig aan met wasbuffer. Neem als referentie/gating een MoAb mee dat reeds getitreerd is: bv een leukocyten cellijn specifieke marker als CD45 of cellijn specifieke markers als CD3 en CD19. Voer de titratie van een MoAb gericht tegen een algemeen voorkomende antigeen uit met "normaal" bloed en/of beenmerg. Bij de titratie van een MoAb tegen een pathogeen of niet



algemeen voorkomend antigeen, kan deze alleen uitgevoerd worden na typering van een bloed, beenmerg, lymfeklierweefsel of BAL monster. Ook kan voor dergelijke MoAbs een positieve cellijn worden gebruikt.

2.2 Bepaling van S/R ratio van de te testen MoAb

- Meet de MFI van een negatieve (R=ruis) en een positieve populatie (target populatie; S=signaal) binnen een bepaalde leukocytenpopulatie.
- De negatieve piek dient binnen de eerste log-decade van de 4 of 5 log-decaden schaal te vallen of rondom het nulpunt van een bi-exponentiële as. Indien hier niet aan wordt voldaan bij de laagste gebruikte titer (bijvoorbeeld titer 1:60 (2,5 µl)), moet een voorverdunding worden gemaakt van de MoAb in PBS/BSA 0,5%.
- Voor de verdunding met het sterkste fluorescentie intensiteit geldt dat er geen events zichtbaar mogen zijn in het rechter deel van de laatste logdecade van het fluorescentie histogram. (Argument: Bij een compensatie-instelling die gericht is op het optimaal compenseren van bijvoorbeeld FL1/FL2 spectrale overlap van zwakke fluorescentiesignalen is het zeer lastig om FL1/FL2 spectrale overlap van zeer sterke fluorescentiesignalen te voorkómen). Bij sterke fluorescentie-intensiteiten kan de geconjugeerde MoAb eventueel worden gemend met ongelabelde MoAb, zodat een verzadigende concentratie behouden blijft maar het fluorescentiesignaal niet te hoog is.
- Maak een grafiek van de signaal/ruis verhouding tegen de hoeveelheid MoAb (verdunding of titer) (zie figuur 1).
De gebruikstiter wordt vastgesteld op de maximale S/R verhouding (plateau niveau). Dit geeft maximale kleuring met het MoAb van positieve cellen met minimale aspecifieke kleuring van de negatieve populatie.

Wanneer een combinatie gebruikt wordt van verschillende MoAbs in één reageerbuisje, dan moeten de afzonderlijke MoAb enkelvoudig zijn getitreerd. De MFI van elke MoAb in het combinatiebuisje mag niet meer dan een half logdecade afwijken t.o.v. die van de enkelvoudige kleuring.

2.3 Controle autofluorescentie

Plaats de gate aan de voet van de “negatieve” populatie zodat <2% van de geselecteerde cellen “vals-positief” zijn.

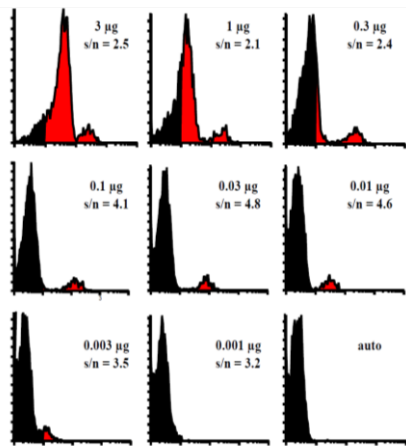
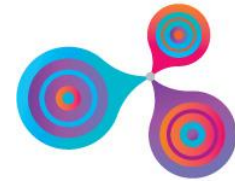
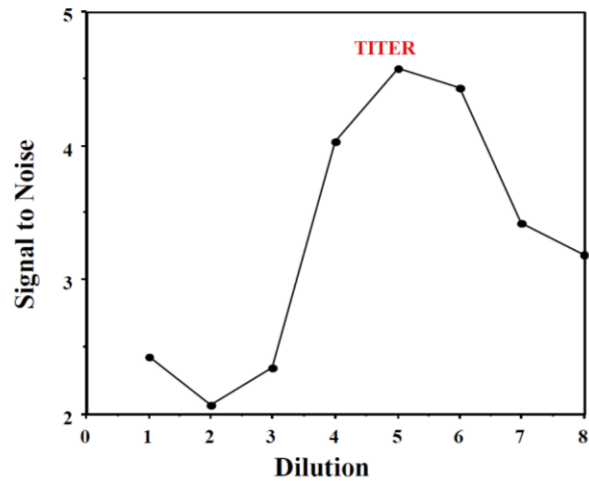


Figure 1. Determining antibody titer.



3. Aanbeveling

Bij ingebruikname van nieuwe batches/nieuwe lotnummers is het goed om deze te controleren met name die van de tandem fluorochromen. Dit kan achterwege gelaten worden wanneer steeds met dezelfde protocollen en antistoffen van dezelfde firma gewerkt wordt en na enkele controles blijkt dat er nooit afwijkingen worden gezien.

Literatuur

Robinson J Paul, Darzynkiewicz Z, Dean P, Hibbs Alan R, Orfao A, Rabinovitch Peter S, Wheelless Leon L. Current Protocols in Cytometry 1997. 0-471-16131-4

Voorst tot Voorst E van, Hooijkaas H, Jakt E.F, Janssen W.C.M., Pinkster T., Schoot C.E. van der. SIHON SOP BOEK, standard operating procedures voor immunotypering van humane bloedcellen 25/05/1999.