

Flow cytometry: where do we come from and where do we go

Van 1 naar ...xyz... kleuren analyses

Frank Preijers

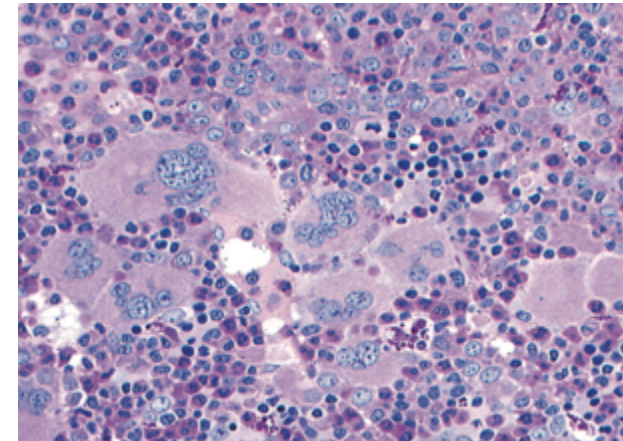
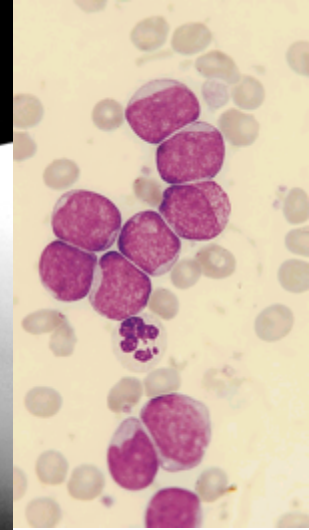
*Dept. Laboratory Medicine – Laboratory for Hematology,
Radboud University Medical Center,
Nijmegen, The Netherlands*

Radboudumc

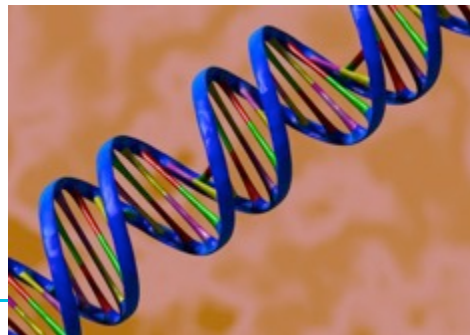
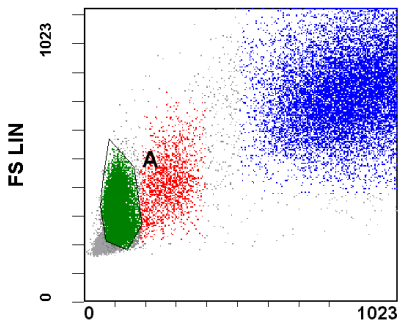


Diagnostische tools om cellen te identificeren

- Morphologie
- Cytohistochemie
- Cytogenetica
- Moleculaire analyses
- **Immunofenotypering**



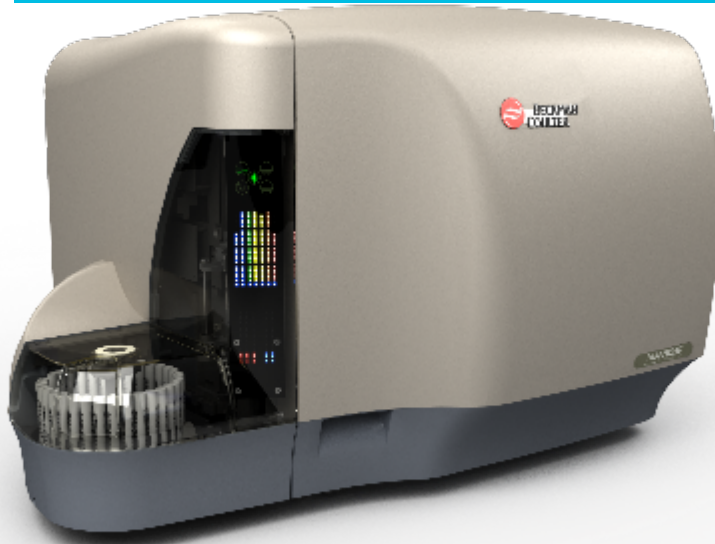
[Ungated] SS LIN/FS LIN



Flow Analyse Today

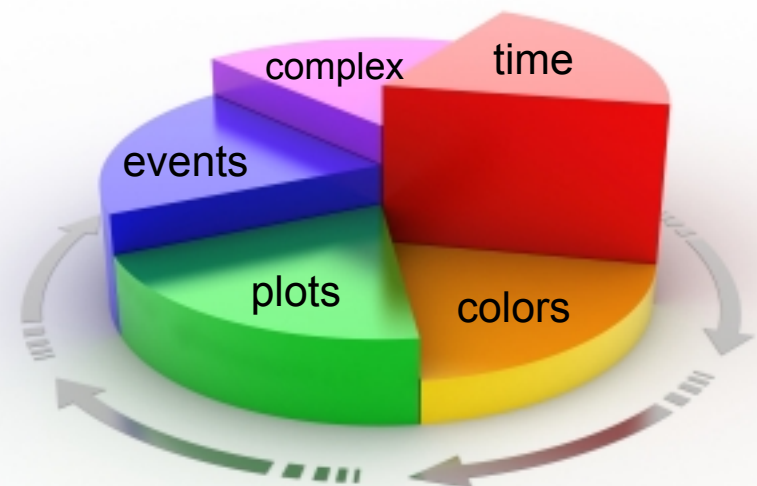
Flowcytometrische immunofenotypering anno 2020:

- Geavanceerde en zeer dynamische multi-kleur FCMs
- Bright fluorochromen
- Hoog-specifieke MoAbs

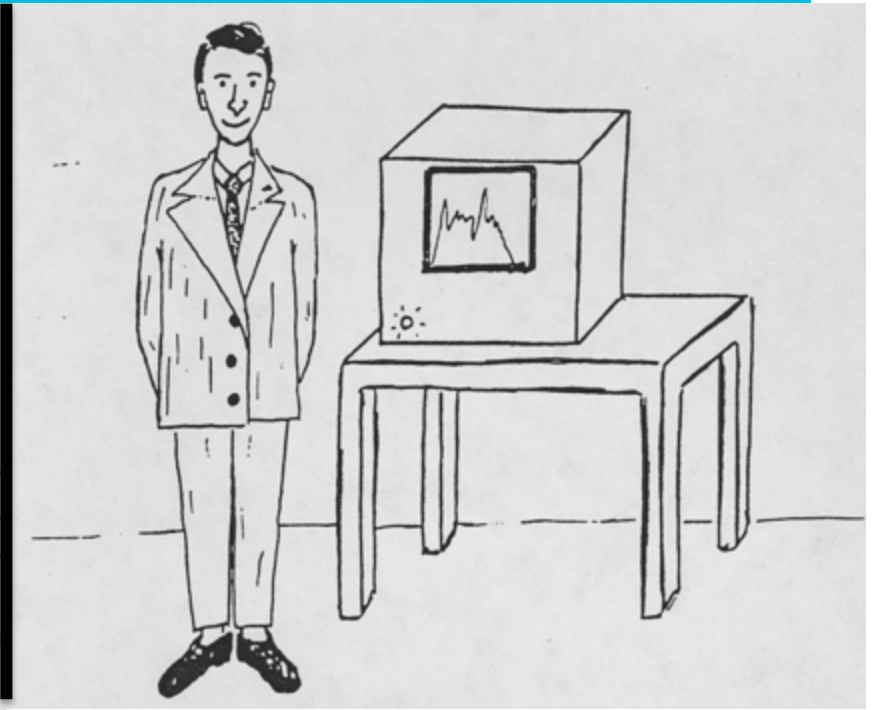


Meer kleuren betekent betere karakterisering, maar vraagt meer plots, events, protocol complexiteit en uiteindelijk toename analyse tijd

Hoe houden we controle over deze techniek en kosten bij uitbreiding van het aantal kleuren?

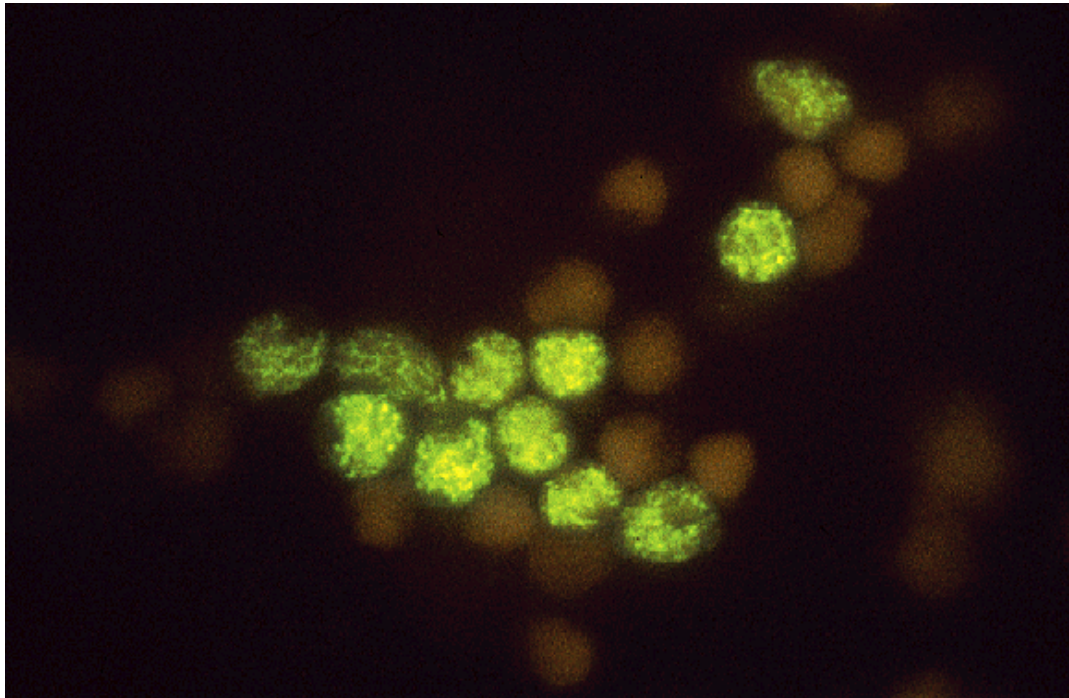


Het verhaal van meer dan een halve eeuw flowcytometrie: “Van 1 naar 50 kleuren”



Immunofluorescentie microscopie

Bloed gekleurd met TdT-FITC (groen)



IF-microscopie in het verleden: een voorbeeld

Een huzaren stukje

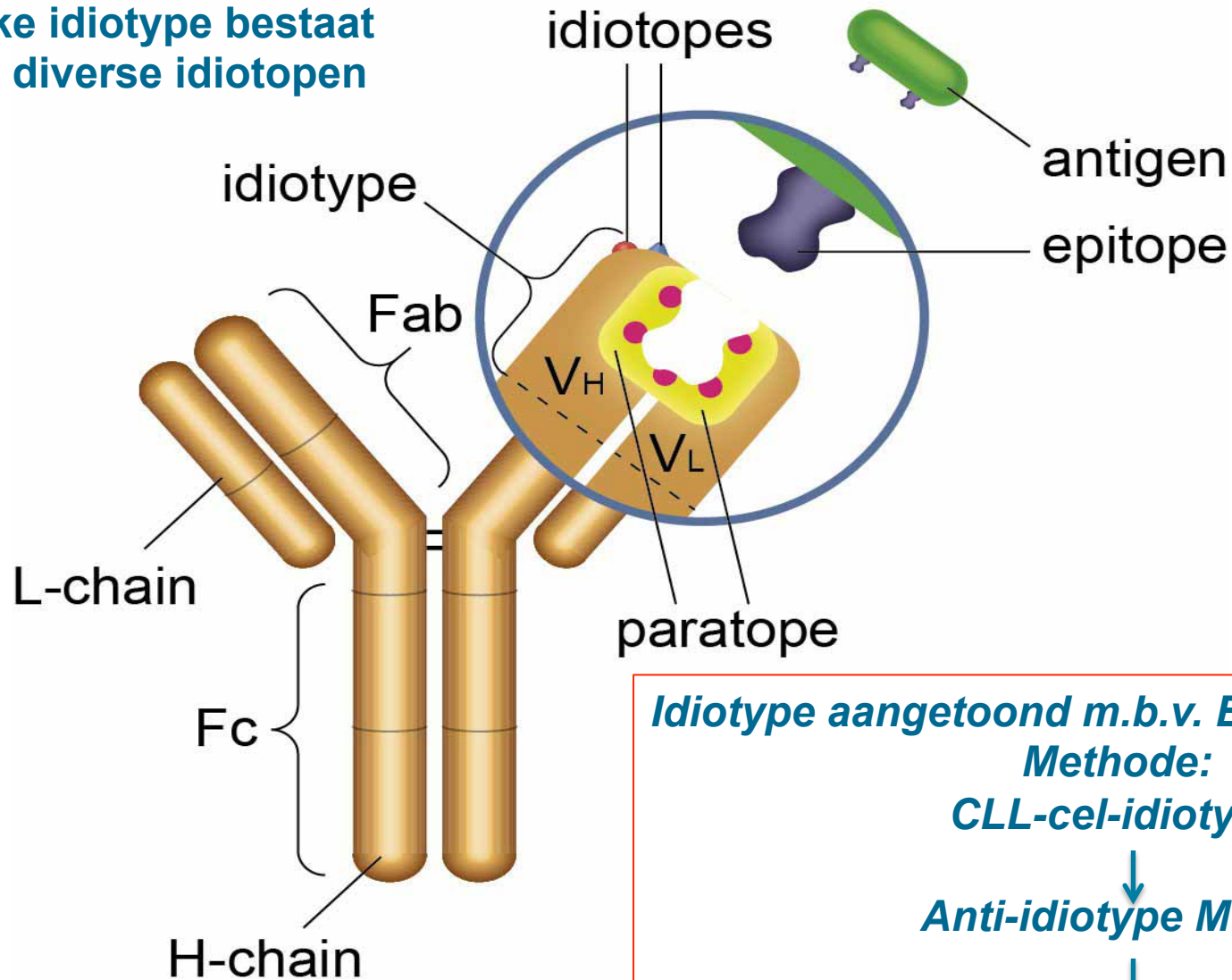
Treatment of B-Cell Lymphoma with Monoclonal Anti-Idiotypic Antibody

Miller RA, Maloney DG, Warnke R, Levy R.

N Engl J Med. 1982; 306: 517-522

Het idiotype monoklonale antilichaam

Elke idiotype bestaat uit diverse idiotopen



Idiotype aangetoond m.b.v. ELISA en IF-mic.

Methode:

CLL-cel-idiotype



Anti-idiotypic MoAb



*G-anti-M-Perox (ELISA)
of G-anti-M-FITC (IF-mic)*

Anti-idiotypie infusie in patient met CLL

Capel P, Preijers F, Allebes W, Haanen C. *Neth.J. of Medicine*, 1985, 28, 112

- Patient: geboren 1931
- Mei 1973: diagnose CLL
- October 1982: chloorambucil ineffectief
- May 1983: WBC=180x10⁹/L, 99% CLL, enorme milt
- CLL: IgG (maar ook IgM, IgD, IgA??), Igkappa
Gedetecteerd met IF-microscoop!
- Vrij-circulerend idiotype IgG: 100µg/ml

Anti-idiotypie infusie in patient met CLL

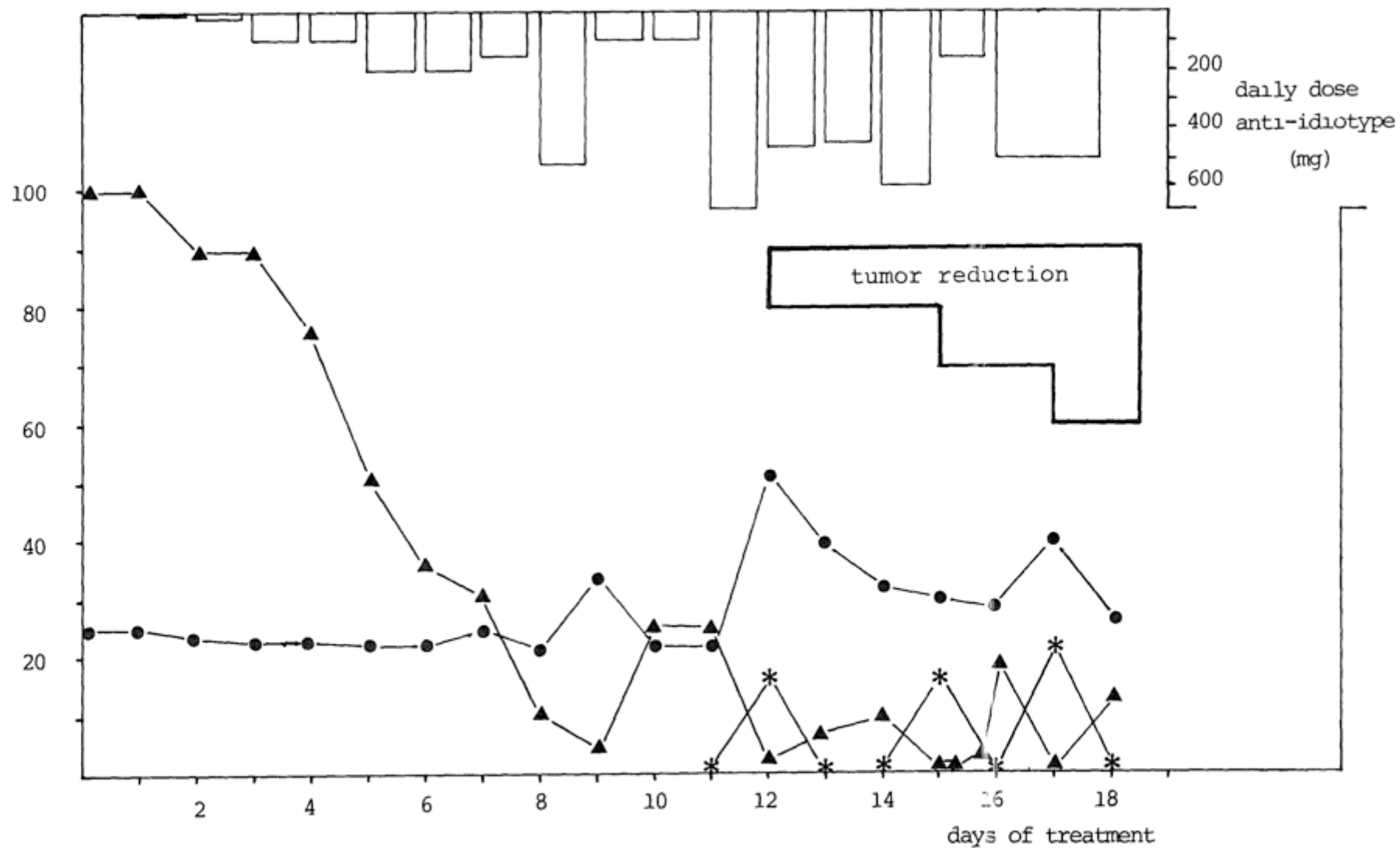
Anti-idiotypie MoAb:

- BALB/c muizen geïmmuniseerd met CLL cellen van de patient
- Miltcellen van BALB/c gefuseerd Sp2/0 cellijn via hybridoma

Techniek volgens Köhler en Milstein (Nobelprijs!!)

- Screening van fusieproduct in microtiter platen CLL (ELISA)
- 1504 Ig-producerende klonen gevonden, slechts 1 anti-idiotypie
- Via ascites productie en zuivering: 40 gram anti-id MoAb

- ▲—▲ Circulating free idiotype ($\mu\text{g/ml}$)
- *—* Circulating free anti-idiotype ($\mu\text{g/ml}$)
- Peripheral blood leukocytes ($\times 10^{-9}/\text{l}$)



Anti-idiotypie therapie

De eerste *personalized medicine en behandeling*

Voorloper van de

1. gehumaniseerde MoAbs therapieën
2. van immunotoxine therapieën (bijv. MoAb-ricine A)

CYTOMETRIE

- * Screening en Monitoring m.b.v. IF-microscoop
- * 1-kleur IF voor CLL-bepaling en anti-idiotypie levels

Voor een adequate IFT dienen meer parameters op 1 cel en verschillende celpopulaties vast gesteld te worden?

Antwoord: Meer-kleuren IF. Maar hoe??

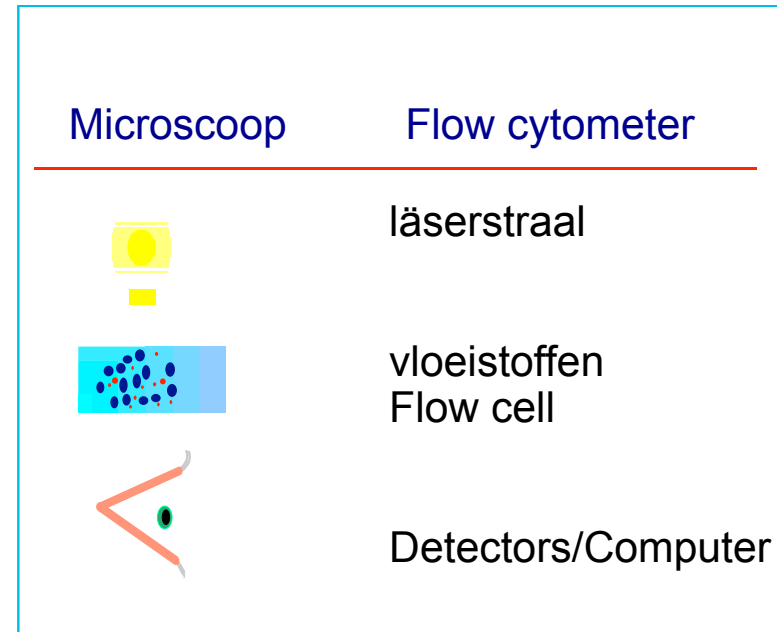
Bepaling van fluorescentie

A. Fluorescentie Microscopie

- Visueel en Subjectief
- Alleen pos/neg
- Alleen klein aantal cellen te tellen
- Kwantificeren lastig/niet mogelijk

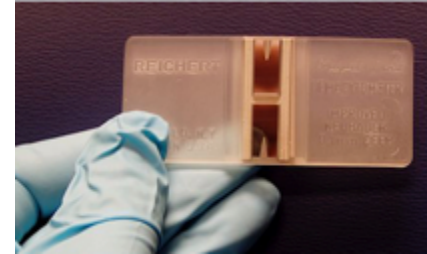
B. Flow Cytometer

- Snel, groot aantal cellen te tellen
- Kwantificeren goed
- Objectief
- Immunologische diff mogelijk (FS/SSC/CD45)

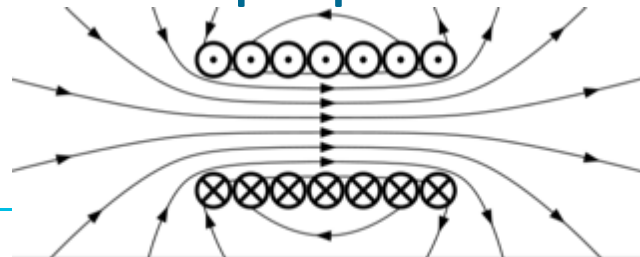


CYTOMETRIE, de historie

- 1890 – Hemocytometer (Karl Bürker)
- 1904 – Fluorescentie UV-microscoop (Rorh, Köhler bij Zeiss), probleem: autofluorescentie
- 1910 – Licht filtratie in UV-microscoop (Heimstädt bij Leica)
- 1930 – Cytofotometry: combinatie van IF-microscoop en spectrofotometer (Caspersson)
- 1954 – Pulse cytometer: Coulter Counter (Wallace Coulter):



eerste FCM gebaseerd op impedantie



Model A Coulter Counter — The first commercial flow cytometer

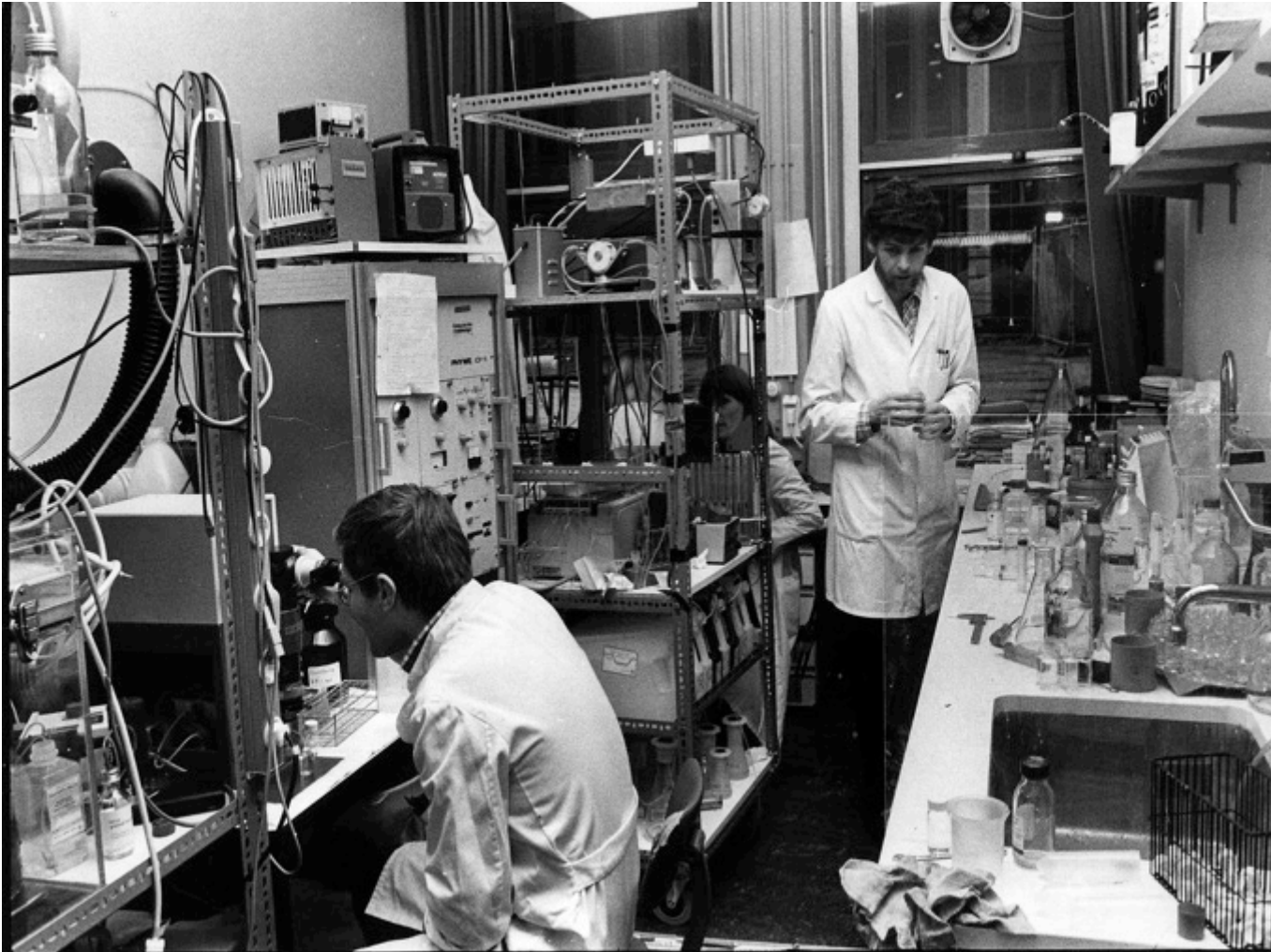
CYTOMETRIE, de historie

- 1968 – Ontwerp van Caspersson (fluor. mic.) werd gecombineerd met een pulse cytofotometer door Dittrich en Göhde (Partec)
- 1970 – Idem door Kamensky als Cytograaf (Bio/Physics systems)
 - Beide systemen: cell counters voor meting van cellaire componenten maar gebaseerd op microscopie

Flowcytometrie

- 1953 – Uitlijning van cellen door hydrodynamic focussing (door Grossland)
- 1954 – Pulse cytometer (Coulter Counter) door Wallace Coulter
- 1960 – Combinatie van uitlijning en laser detectie (door Dilla)
- 1978 – Pulse cytofotometrie verandert in flowcytometrie!

Lang geleden (begin '70)...

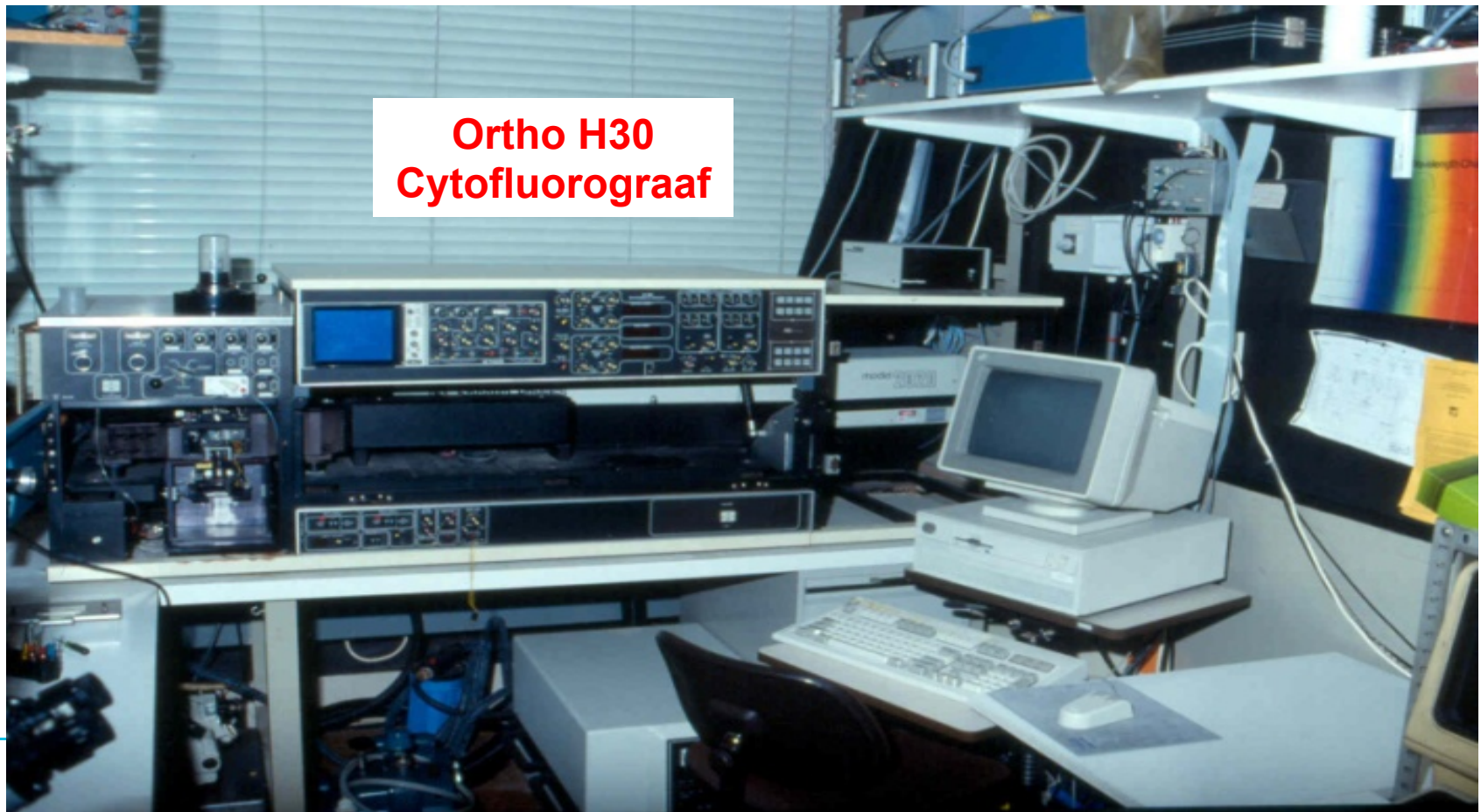


**Piet
van
Erp**

**Arie
Pennings**

Symposium on Pulse Cytophotometry

- First International Symposium on Pulse Cytophotometry in Nijmegen, 1974
- Eén parameter – DNA meting: Celcyclus analyse en DNA afwijkingen a.g.v. Cytostatica (acridine oranje of propidium jodide)





DE FLOWCYTOMETER

PHOE WERKT DIEP

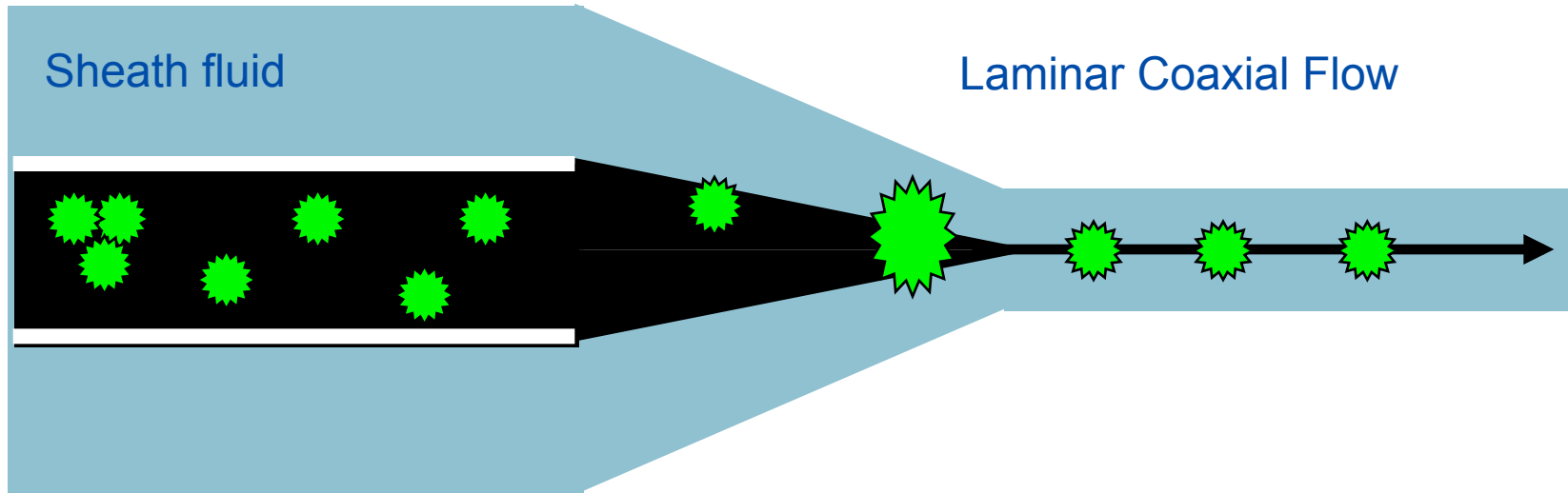


FUND
WITHIN 48

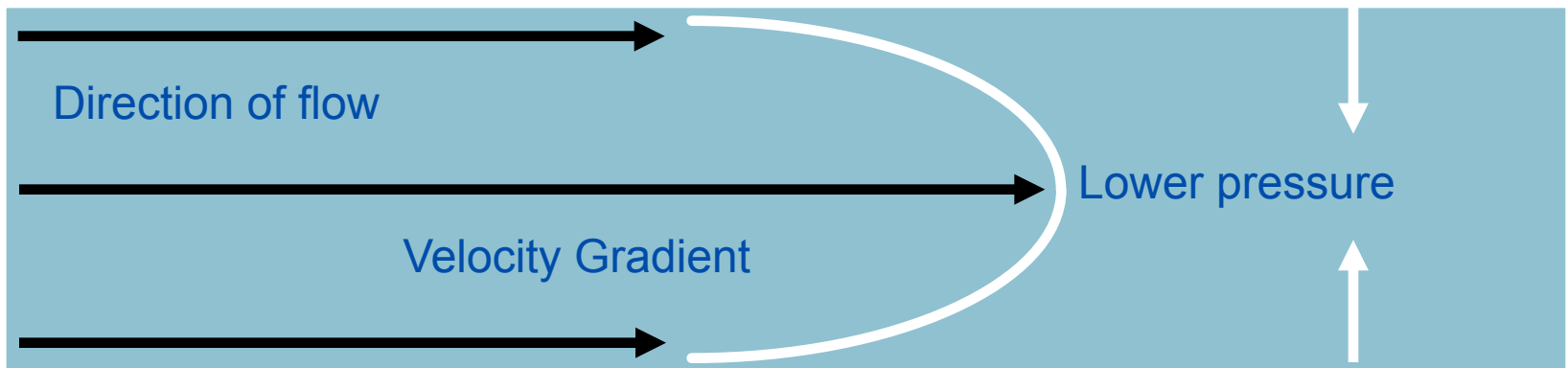
Hoe kan ik licht en
waterstroom
gebruiken om mijn
target te
identificeren

PRE
#HISTORY

Hydrodynamic Focusing



The Bernoulli Effect



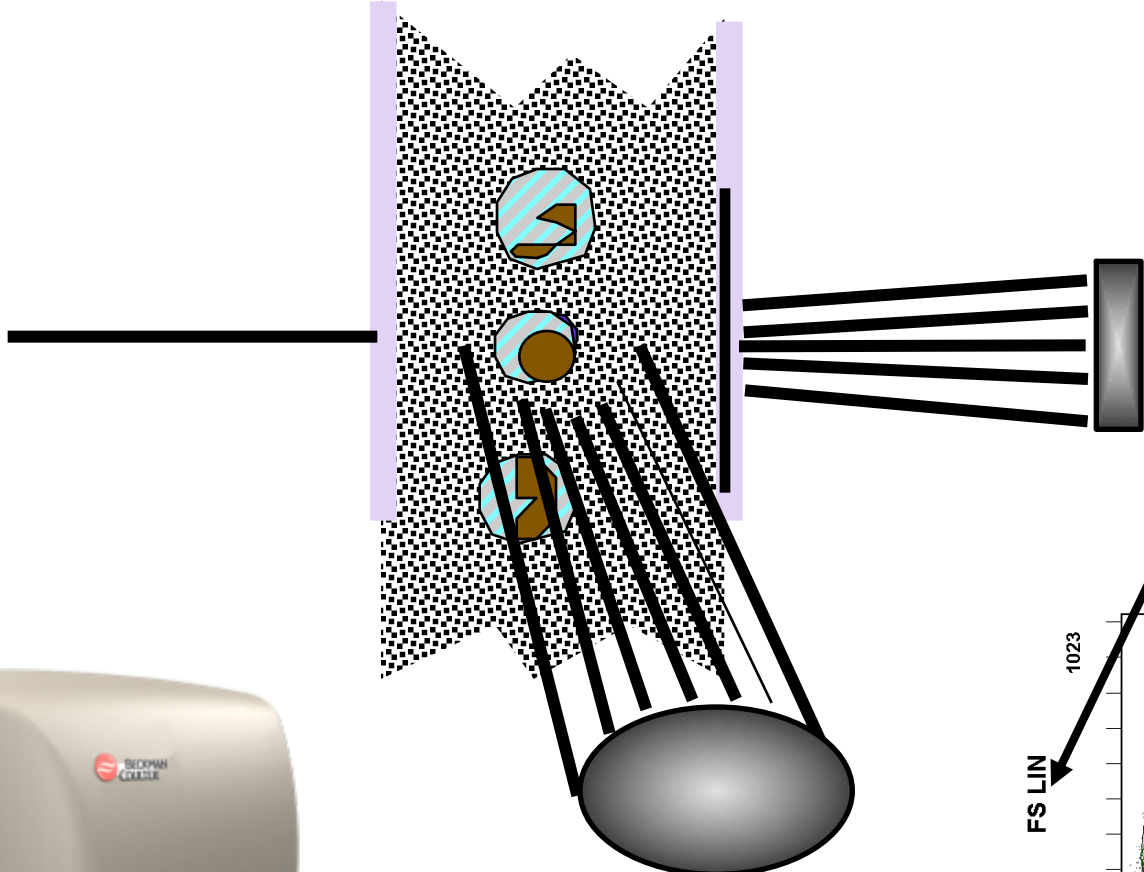
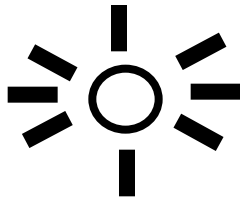
Viscous drag along walls.

Particles move to low pressure area

Flowcytometer -

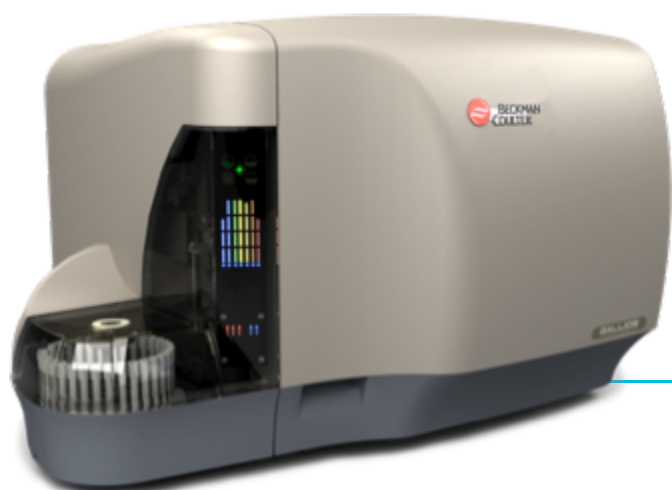
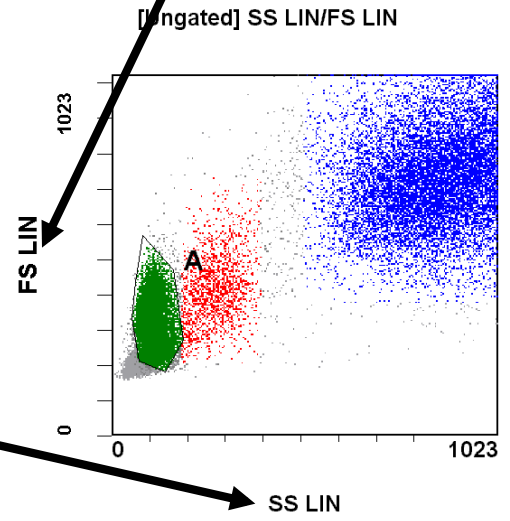
Light Scatter

laser

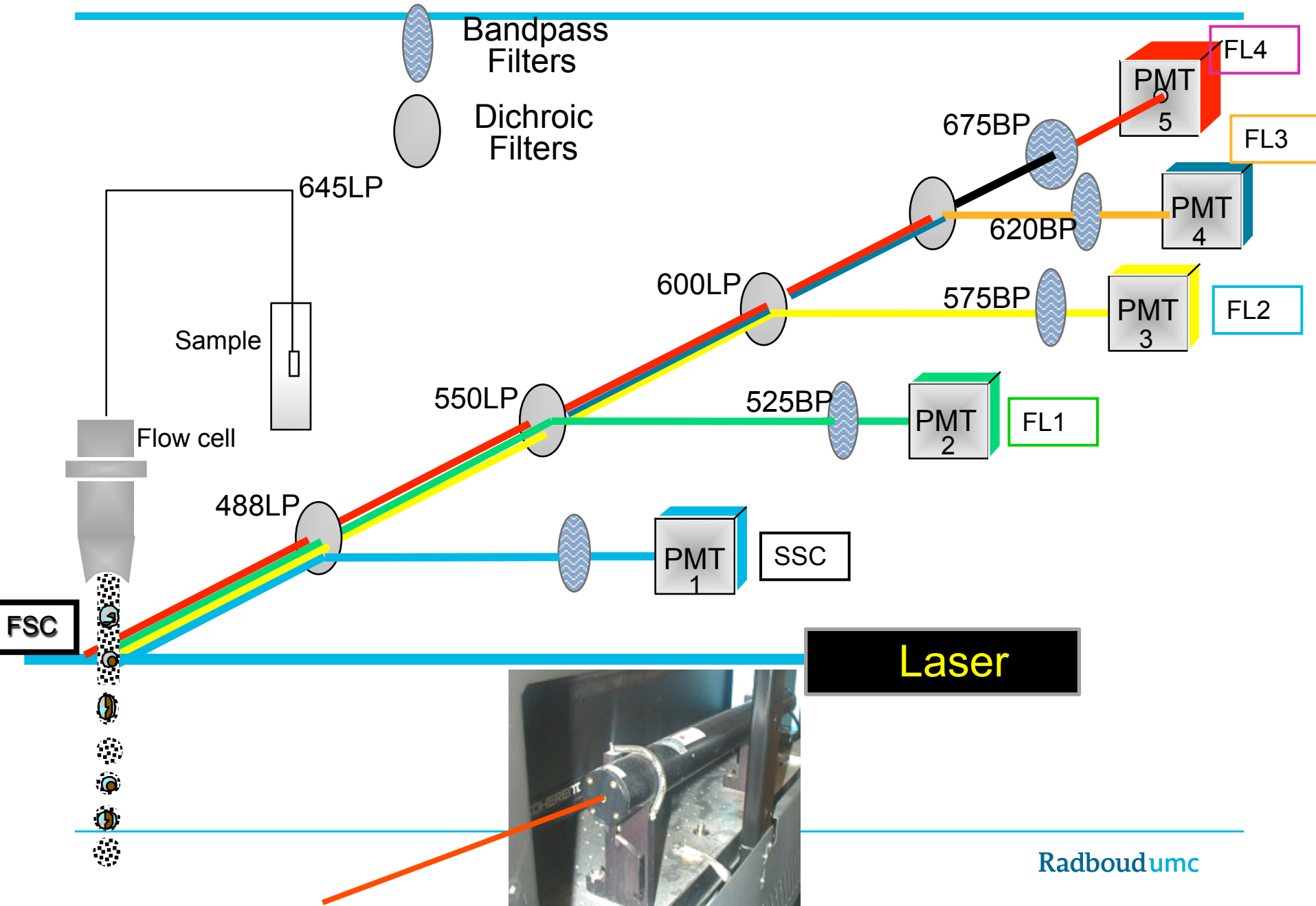


FS sensor

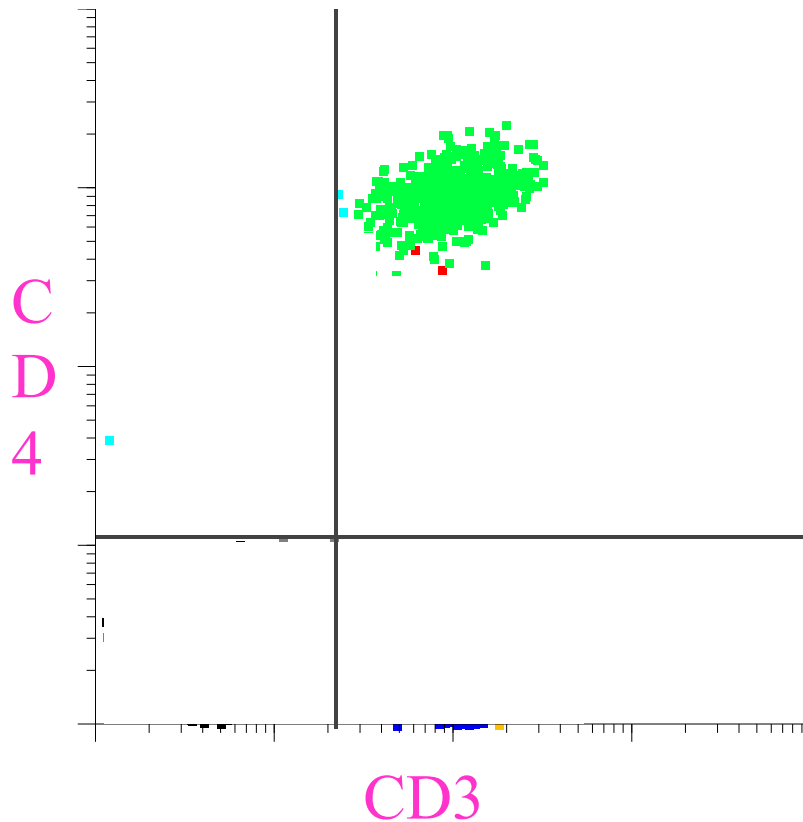
90 SS sensor



Mechanism of Flow Cytometer

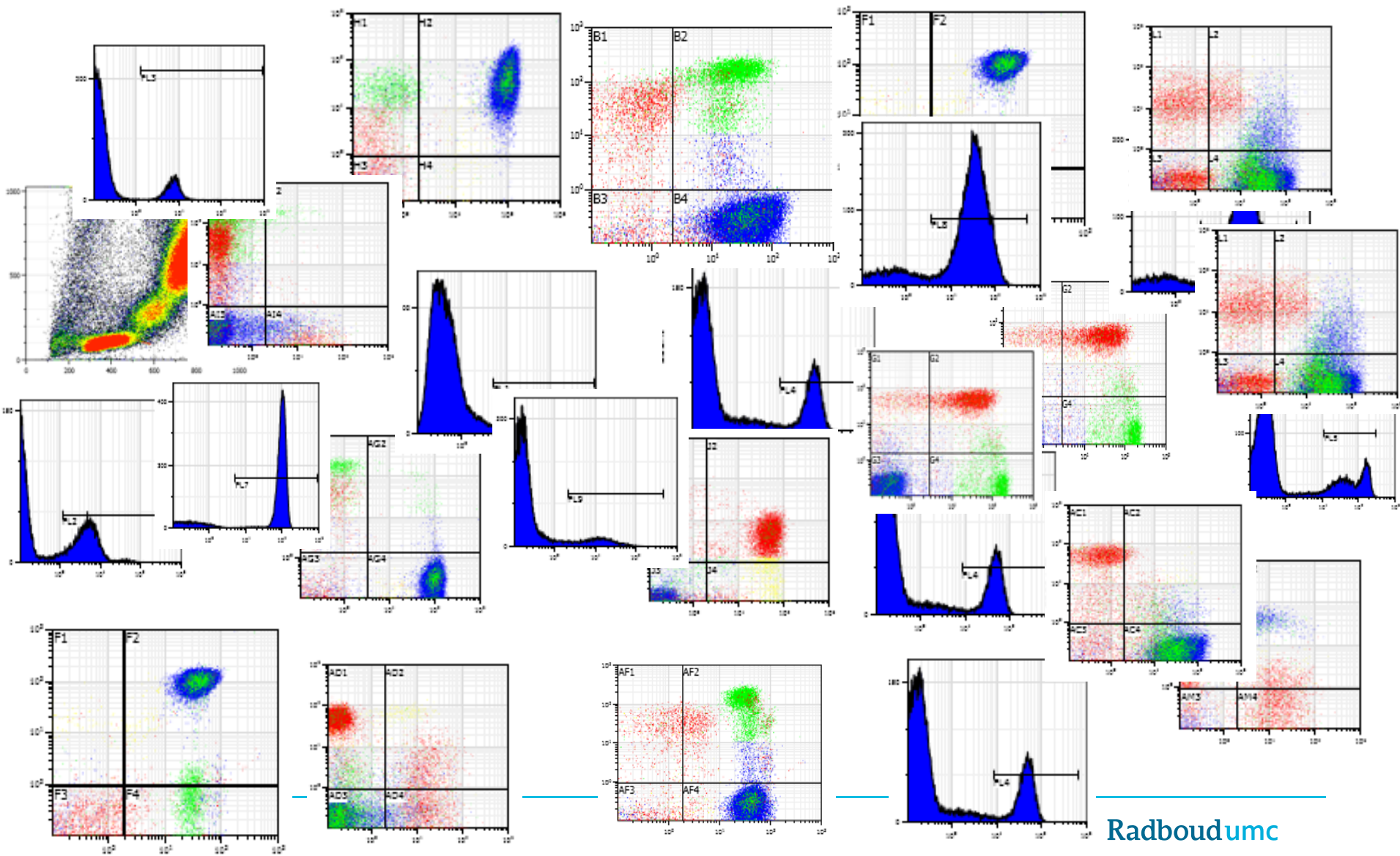


Patronen van Cel Clusters



CD3+CD4+	green
CD3-CD4+	cyan
CD3+CD4-	cyan
CD3-CD4-	black

Analyse van data – 8/10 kleuren



Monoklonale antilichamen in CD's

"Leucocyte Typing Workshop" (HLDA)

	Workshops	Aantal MoAbs	CD-codes bepaald
I	Paris, 1982	±150	CD1-CDw15
II	Boston, 1984	±350	CD16-CDw26
III	Oxford, 1986	±900	CD27-CD45
IV	Vienna, 1989	±1100	CD46-CDw78
V	Boston, 1993	±1450	CD79-CDw130
VI	Kobe, 1996	±1150	CD131-CD166
VII	Harrogate, 2000	±270	CD167a-CD247
VIII	Adelaide, 2004	±100	CD248-CD339
IX	Barcelona, 2010	???	CD339-CD363
X	Sidney, 2014	???	CD364-CD371
XI	Pending	???	



**1993: Epics XL
CL3/CL4**

**1-laser:
FITC-PE-ECD-PECy5**

**1994: FACS Calibur
4-CL**

**2-laser:
FITC-PE-PERCP-APC**



3-KLEUREN LABELLING VOOR DE IMMUNOFENOTYPERING VAN HEMATOLOGISCHE MALIGNITEITEN
(in bloed and beenmerg)

ONRIJPE MALIGNITEITEN (prec-B-ALL, T-ALL, AML, CML-BC)

SIHON FCM werkgroep
1998

FASE 1: Screening & Lineage definitie

Gecombineerde fase 1 voor screening onrijp/rijp			
1.	CD34 ¹	CD117	CD45
2.	CD36	CD13.33	CD14
3.	CD5	CD7 ²	CD3
4.	CD4	CD8	CD3
5.	CD3	CD16.56	CD38
6.	Smlgκ	Smlgλ	CD19
7.	CD10	CD20	CD19

FASE 2: Classificatie

T-ALL

8.	MPO	CyCD79	CyCD3 ³	(lineage)
9.	CyTdT	CD5	CD19	(T-ALL/prec. B cellen)
10.	CD2	CD1 ⁴	CD7 ⁵	} differentiatie stadium en subclassificatie T-ALL/T-NHL)
11.	TCRαβ	TCRYδ	CD3	

Precursor B-ALL

8.	MPO	CyCD79	CyCD3 ³	(lineage)
9.	CyTdT	CD5	CD19	(T-ALL / pre. B-ALL)
10.	CD34 ¹	CD22	CD45	(onrijp B-cellen)
11.	CyIgμ	Smlgμ	CD19	(common / pre-B-ALL)

AML

8.	MPO	CyCD79	CyCD3 ³	(lineage)
9.	CD11b/c	MPO	HLA-DR	(myeloide diff/mono.)
10.	CD15(MM1) ⁶	CD13	CD34 ¹	(myeloid diff.)
11.	CD36	CD15	CD14	(mono/rijpe gran.)
12.	CD235a ⁷	CD33	CD61	(erytroid diff.)

Als CD61 positief is ook:

13.	CD41	CD42	CD13.33	(megakaryocyt. diff.)
-----	------	------	---------	-----------------------

FASE 3: Extra kleuringen voor speciale doelen, zoals MRD analyse

T-ALL

12.	CyTdT	CD7	CD5
13.	CyCD3	CD16.56	SmCD3

Precursor B-ALL

12.	KORSA	CD15	CD19
13.	CD34	CD19	CD13.33
14.	TdT	CD10	CD19

AML

14.	CD7	CD56	CD13.33
15.	CD4	CD133	CD13.33



1. CD34: gebruik alleen klasse III antilichamen
2. CD7 als PE: betere detectie van variabele expressie patronen
3. Bevestiging van lineage
4. De combinatie kan vervangen worden door CD1-FITC/CD2-PE/CD7
5. CD7 is nog niet beschikbaar als PERCP. Kan vervangen worden door CyCD3
6. CD15: gebruik kloon MM1 ivm. brede herkenning van subgroepen
7. GpA is geclusterd als CD235a

VIERKLEUREN LABELINGSSCHEMA VOOR IMMUNOFENOTYPERING VAN HEMATOLOGISCHE MALIGNITEITEN

ACUTE LEUKEMIEËN (prec-B-ALL, T-ALL, AML, CML-BC)

FASE 1: Screening & Lineage definitie (snel en makkelijk)

	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>ECD</i>	<i>CY-5</i>
1	CD2	CD7	CD3	CD5 ¹
2	CD10	CD20	HLA-DR	CD19
3	CD34	CD117	CD45	CD13.33
4	CD15(Leu-M1)	CD138 ²	CD45	CD14 ³

Gecombineerde fases 1 voor screening acuut/chronisch

	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>ECD</i>	<i>CY-5</i>
1	CD2	CD7	CD3	CD5
2	CD4	CD16.56	CD3	CD8
3	SmIg	SmIg	CD19	CD38
4	CD10	CD20	HLA-DR	CD19
5	CD15	CD138	CD45	CD14
6	CD34	CD117	CD45	CD13.33

FASE 2: Classificatie

T-ALL⁴

	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>ECD</i>	<i>CY-5</i>
5	MPO	CyCD79	CyCD3	SmCD3
6	CyTdT	CD10	CD19	CD5
7	CD4	CD1	CD3	CD8
8	TCRαβ	TCRγδ	CD3	(CD16.56)

Precursor B-ALL⁴

	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>ECD</i>	<i>CY-5</i>
5	MPO	CyCD79	CyCD3	SmCD3
6	CyTdT	CD10	CD19	CD5
7	Smκ	Smλ	CD19	CD10
8	CD45	CD34	CD19	CD22
9	CyIgμ	SmIgμ	CD19	HLA-DR

Optioneel: CD22, CD24 (in plaats van CD19)

AML⁴

	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>ECD</i>	<i>CY-5</i>
5.	MPO	CyCD79	CyCD3	TdT
6.	HLA-DR	MPO	CD45	CD11b/c
7.	CD36	CD15(IQP)	CD45	CD4
8.	CD61	GpA	CD45	CD33

Bij CD61 positiviteit:

9.	CD41	CD42	CD45	CD13.33
----	------	------	------	---------

FASE 3: extra labelingen voor speciale doeleinden, b.v. MRD

Voorbeeld MRD:

9	CyCD3	CD16.56	SmCD3	CD7
10	TdT	CD7	CD19	CD5
11	TdT	CD7	CD24	CD8

Voorbeeld MRD:

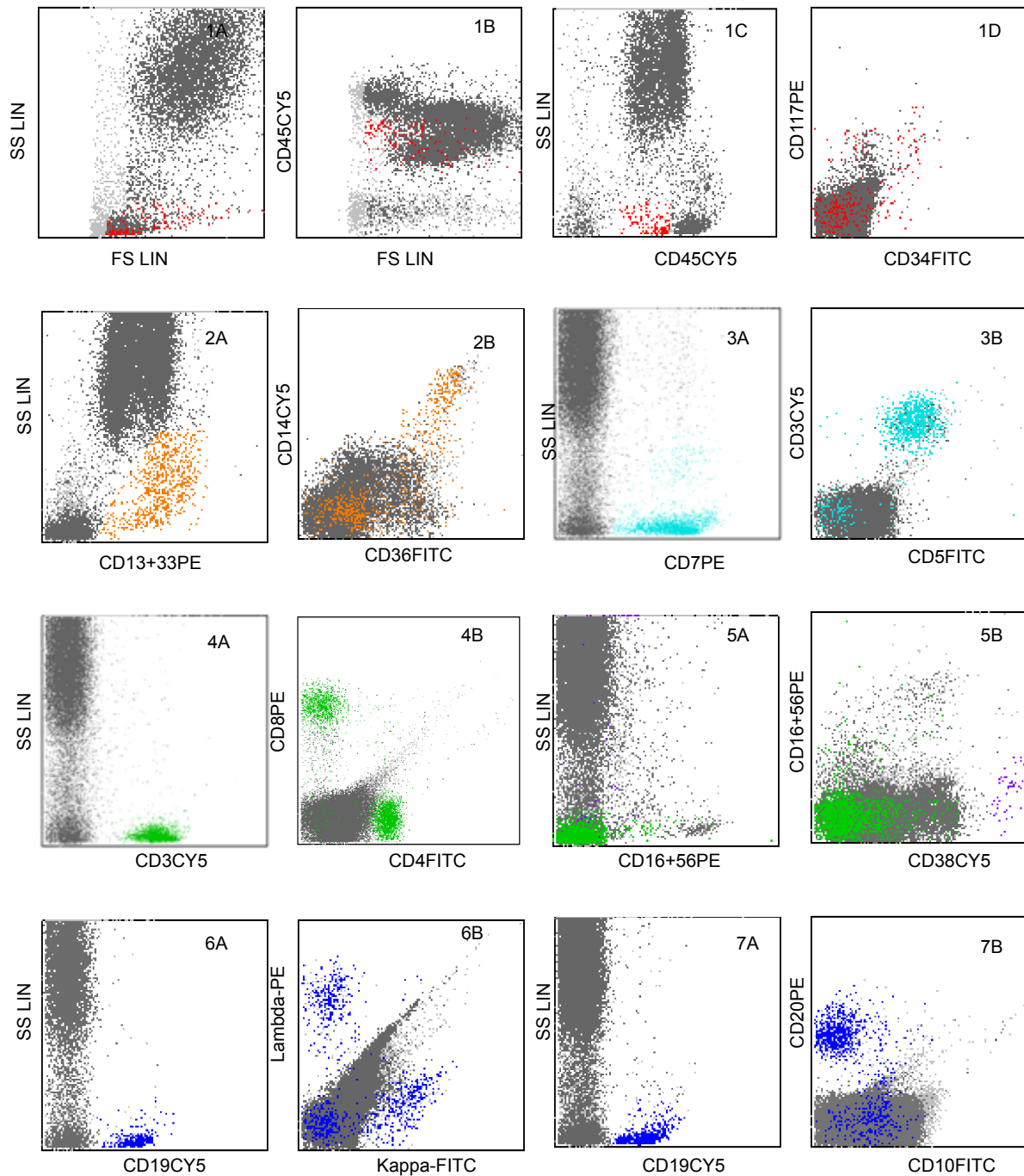
10	KORSA	CD15	CD19	CD13.33
11	TdT	CD10	CD45	CD19

Voorbeeld MRD:

10.	CD7	CD56	CD45	CD13.33
11.	CD2	AC133	CD45	CD13.33

1. CD7 in PE: Betere detectie van verschillende expressie patronen; wanneer CD2-APC beschikbaar is, CD2 vervangen door CD5.
2. Voor het geval dat celmateriaal de volgende dag wordt geanalyseerd (>12hrs), CD138 vervangen door CD 38 .
3. Ter completering van differentiatie.
4. In alle tweede fases (lymfocytair) ter completering lineage.

Figuur 1: NORMAAL BEENMERG



**Atlas van 22 cases
3-kleuren panel**

-
**zie
www.cytometrie.nl**

Monsterbewerking

	<u>2002</u>	<u>2006</u>
Ery-lysis	55	56
Gradiënt	1	0

Detectie

	<u>2002</u>	<u>2006</u>
Flowcytometer	55	56
Microscoop	1	0

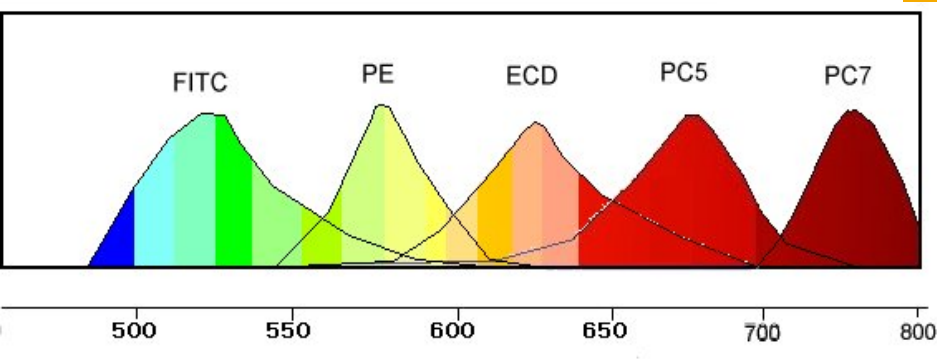
Evaluatie analyse methode

(%) deelnemers

	<u>voorjaar2002</u>	<u>najaar 2004</u>	<u>2006</u>
1,2-kleuren IF	10 (18%)	4 (7%)	1 (2%)
2/3 of 1/2/3-kleur. IF	11 (20%)	11 (18%)	5 (8%)
(2-,)3- en 4-kleur. IF	2 (4%)	10 (16%)	7 (12%)
3-kleuren IF	25 (45%)	19 (31%)	11 (19%)
4-kleuren IF	6 (11%)	12 (20%)	25 (42%)
5-kleuren IF	0	4 (7%)	5 (8%)
6-kleuren IF			4 (7%)



**In 2000: FC500
5-kleuren**



**Welkom in het
Multi-kleur millennium**

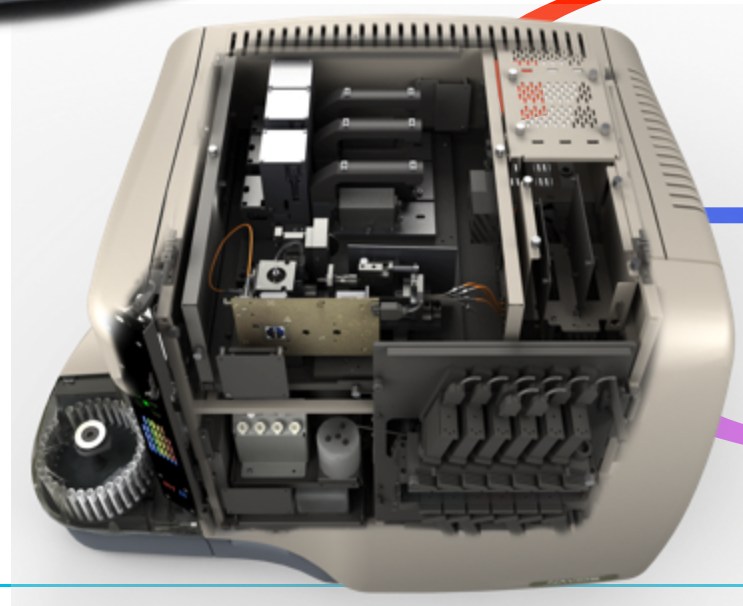
**In 2006: FacsCanto II
8-kleuren**



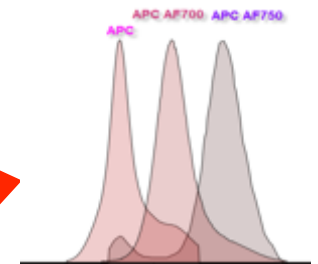
2009: Introductie van 10-kleuren IFT



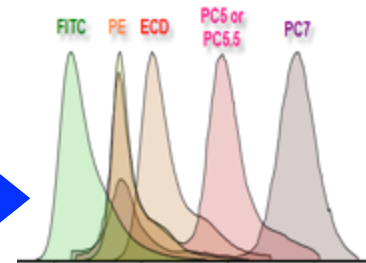
- NAVIOS/GALLIOS
- 3 lasers
- 10-colors



638nm



488nm



405nm



Hoeveel kleuren is genoeg: What is next?

8-kleuren (FacsCanto II) / 10-kleuren (Navios)



12-kleuren (FacsLyric) / 13-kleuren (Cytoflex Dx)



Nieuwe generatie flowcytometers: >20 kleuren

Cytometry

PART A
Journal of the
International Society for
Advancement of Cytometry

Cytometry Part A • 93A: 186–189, 2018

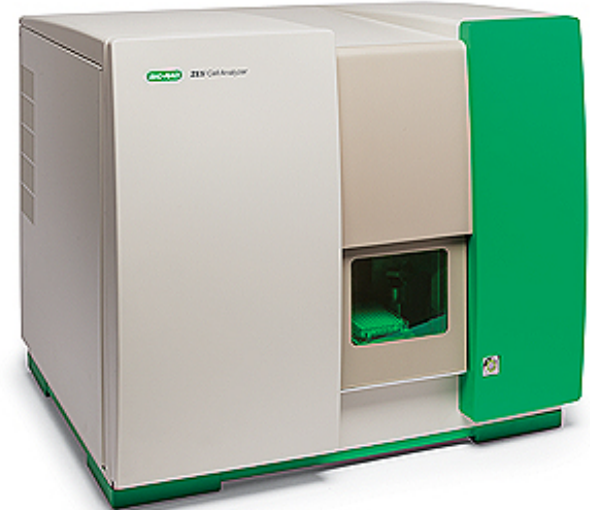
**OMIP-042: 21-Color Flow Cytometry to
Comprehensively Immunophenotype Major
Lymphocyte and Myeloid Subsets in Human
Peripheral Blood**

Nieuwste generatie instrumenten

Beckman Coulter Cytoflex LX
23-detectors/6 lasers



Biorad ZE5
30 detectors/5 lasers



Novocyte/Agilent
27-detectors/5 lasers



- ✓ Gebrek aan conjugaten (MoAb-fluorochroom combinatie)
- ✓ Complex controle van spectrale overlap

Ontwikkeling in de Flowcytometer

Verbetering in:

- a. Aantal en kwaliteit van lasers**
- b. Aantal te analyseren kleuren**
- c. Optiek resulterend in verbeterde resolutie**

Sony / Cytek Aurora Spectral analyzer

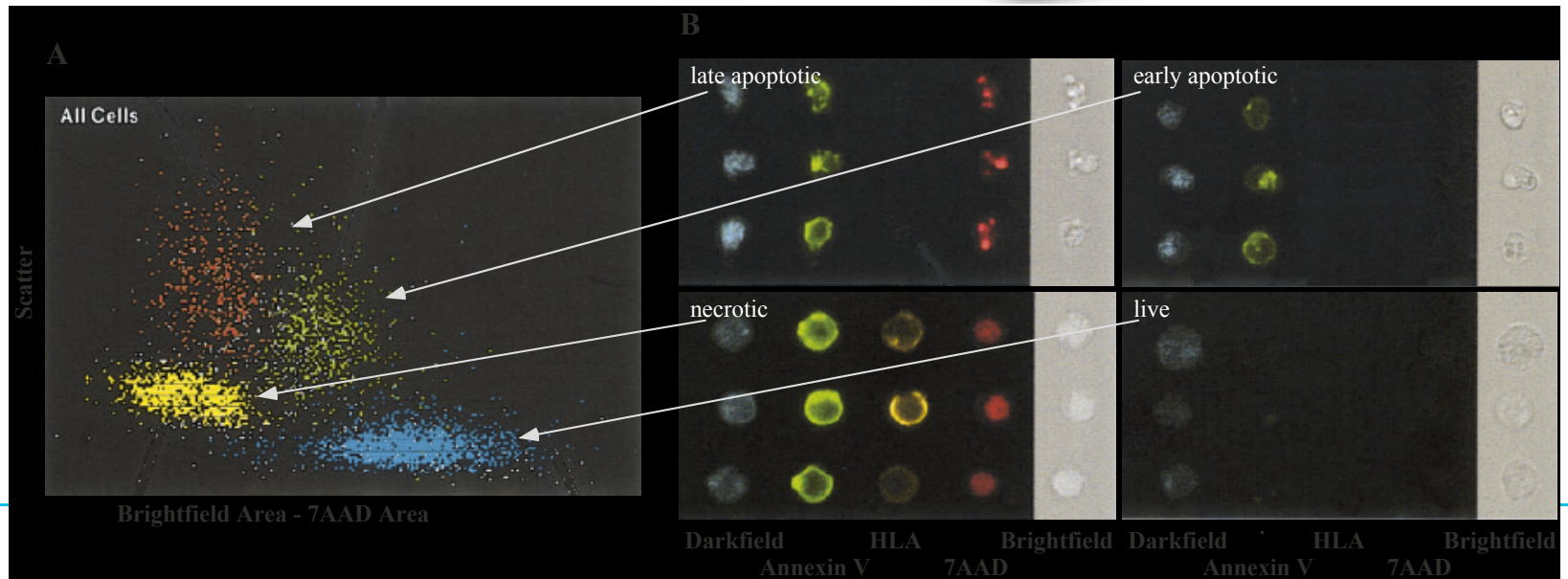
No spectral overlap:

- **Determination of full spectrum of fluorochrome**
- **No compensation necessary**
- **More combinations of fluorochromes possible**
- **More colors possible (>>20)**



Combining the Flow cytometry and Imaging

amnis® Imaging and Analysis of Cells in Flow



Multi-kleur Flowcytometers beschikbaar maar is multi-kleur panel realistisch?

Hoe stel je een multi-kleur combinatie samen?

- Welk antigeen?
- MoAb-kloon / fluorochroom selectie
- Single conjugaat titratie / spectrale overlap compensatie
- PMT settings
- Compensaties in de panelmix (Fluorescence minus one [FMO] uitvoeren!)
- Analysis protocol (bijv. KALUZA of INFINICYT)

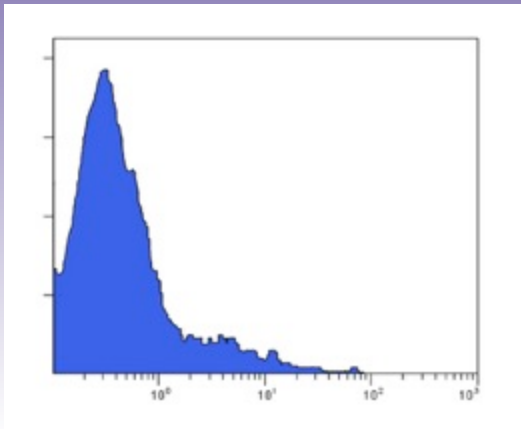
FITC	PE	ECD	PECy5.5	PECy7	Pac B	Krome O	APC	APC-A700	APC-A750
CD34 Igkappa	CD7 Iglambda	CD4	CD10	CD117 CD56	CD15 CD20	CD45	CD3 CD33	CD8	CD19

..... Maar wat zijn randvoorwaarden voor deze panels?

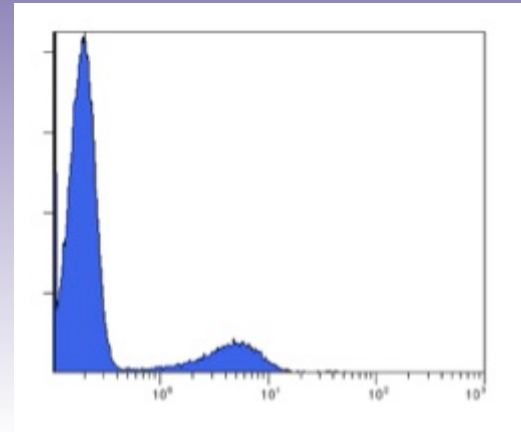
MoAbs and Fluorochromes

Specifieke MoAbs: kloon selectie

CD56-PE, MY31
Clone



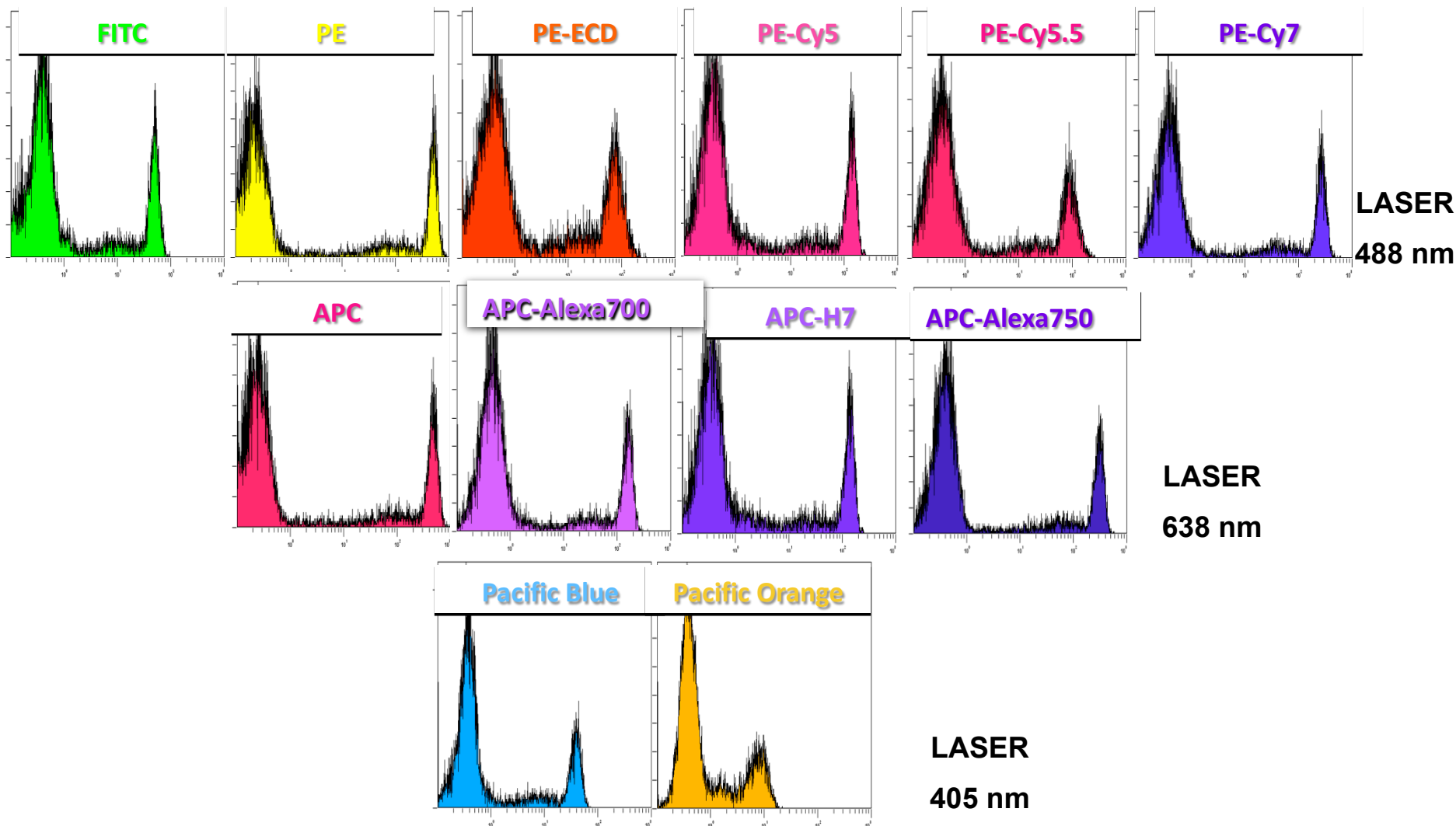
CD56-PE, NKH-1
Clone



Kloon selectie gebaseerd op resultaat

Beschikbare Fluorochromen voor 8- tot 10-kleuren

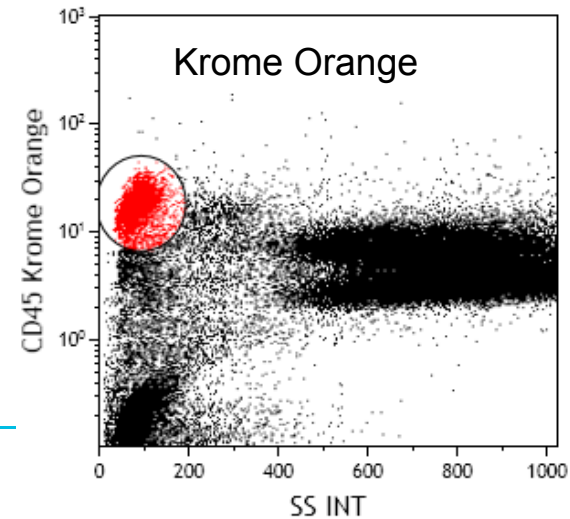
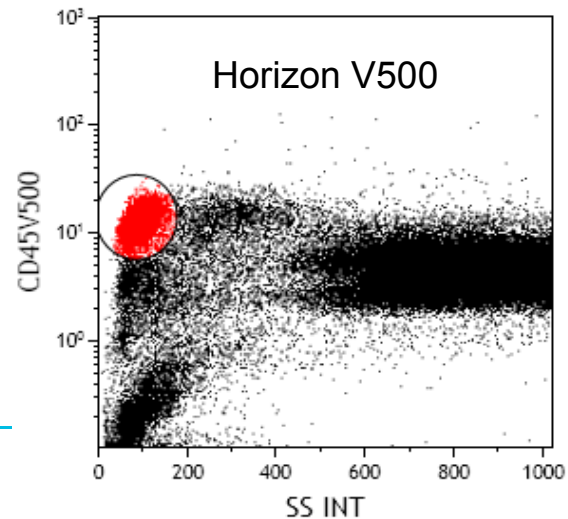
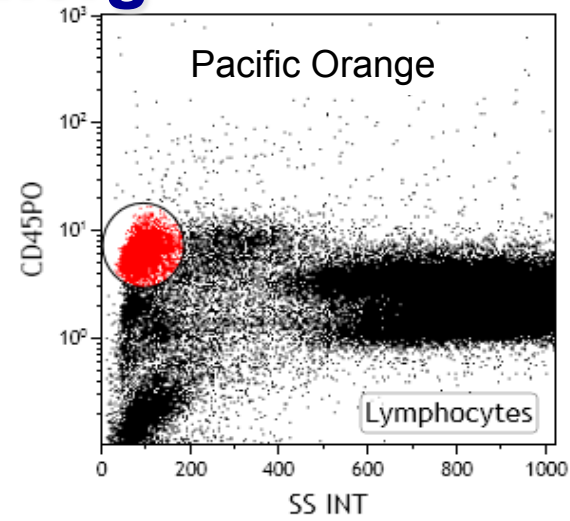
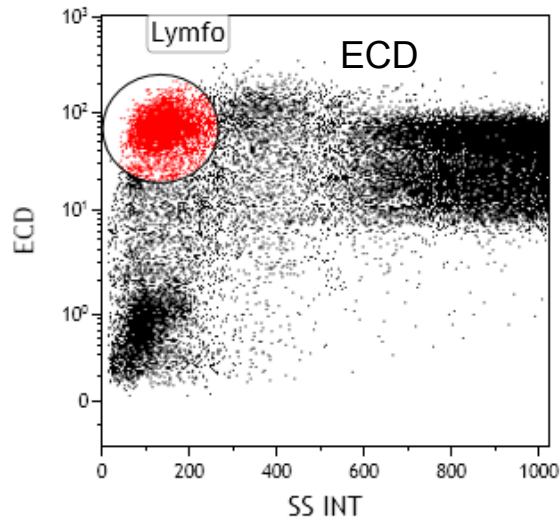
Sterke fluorochromen: voor detectie van zwakke antigenen



Nieuwe fluorochromen noodzakelijk voor >13-kleuren IF

HorizonV500 / Krome Orange

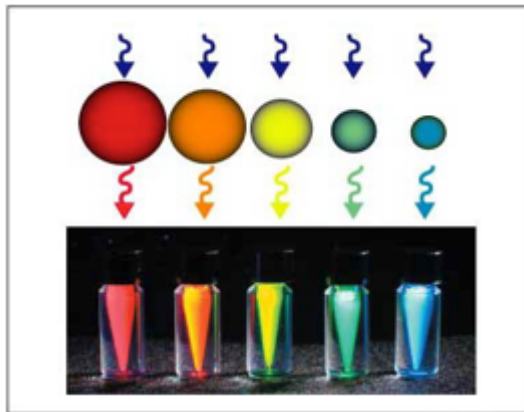
Beenmerg



Nieuwe fluorochromen: organische polymeren met hoge capaciteit van energie-absorptie

>2000

Qdot Nanocrystal dyes

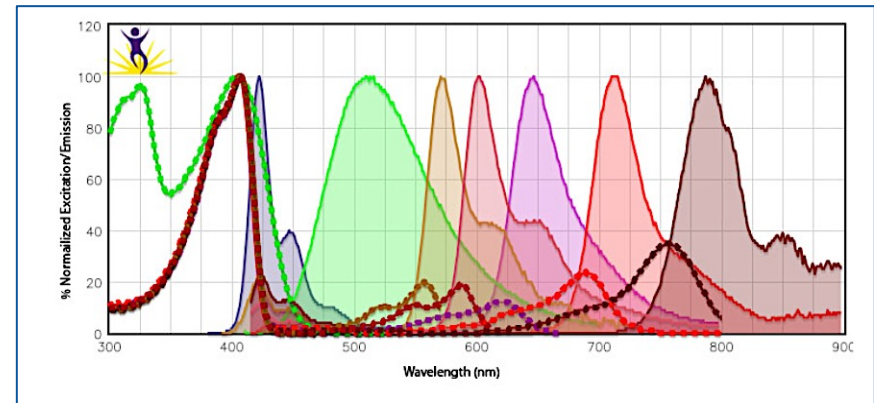


Bright but excitation with different laser lines.

>2011

Brilliant (Ultra)Violet: polymer dyes

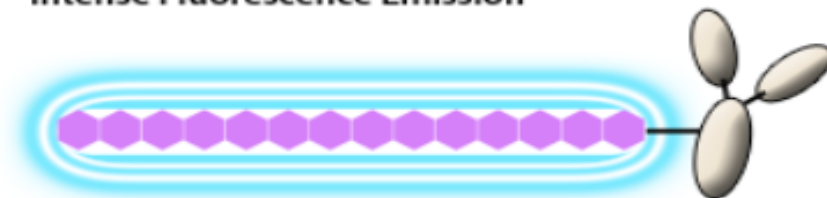
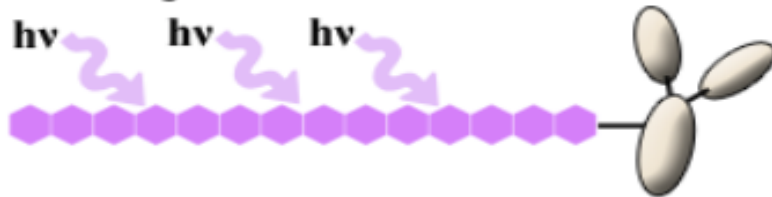
High number of dyes with different emission



Brilliant (Ultra)Violet

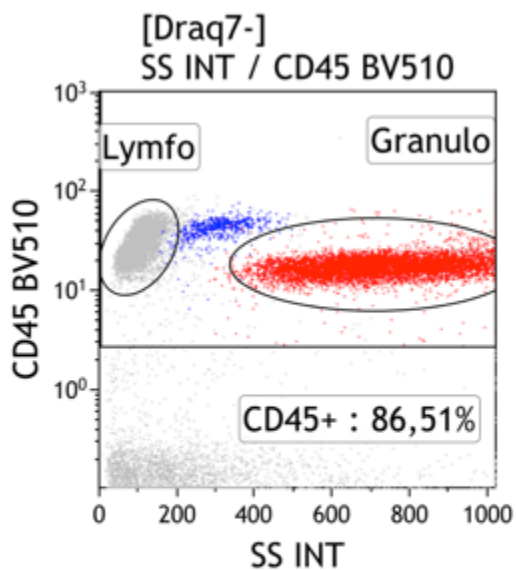
Intense Fluorescence Emission

Light Harvesting

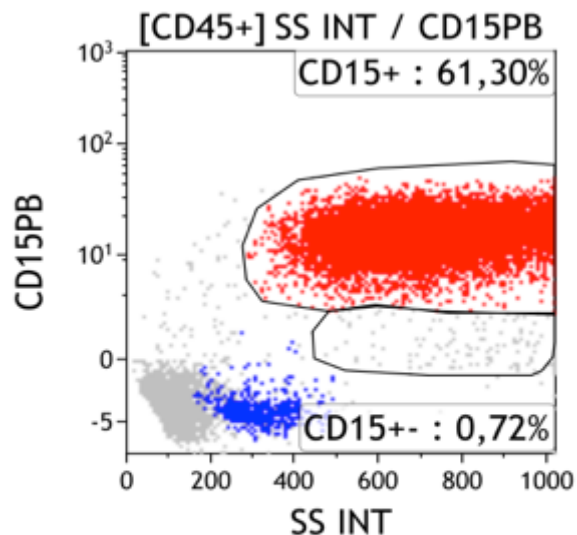


Nieuwe fluorochromen: eFluor organische polymeren en nanokristallen

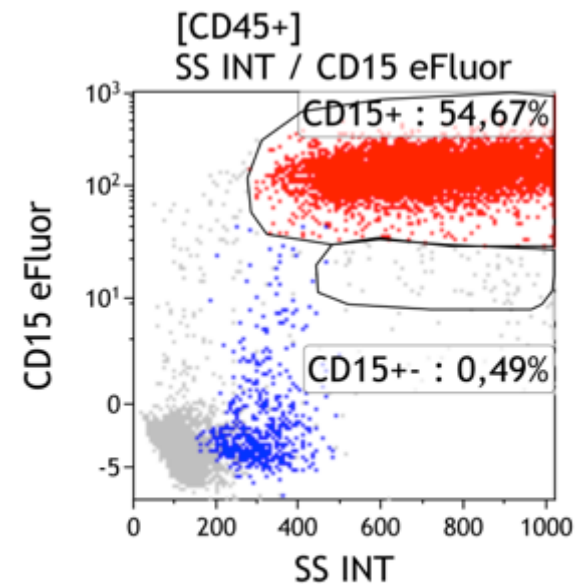
Violet laser dye: PacBlue versus eFluor450



Gate	Number	%Total	%Gated
All	23.394	93,10	100,00
CD45+	20.238	80,54	86,51
Granulo	9.601	38,21	41,04
Lymfo	8.085	32,18	34,56



Gate	Number	%Total	%Gated
All	20.869	83,05	100,00
CD15+	12.792	50,91	61,30
CD15+-	151	0,60	0,72



Gate	Number	%Total	%Gated
All	20.238	80,54	100,00
CD15+	11.064	44,03	54,67
CD15+-	100	0,40	0,49

Ontwikkeling in toepassing van MoAbs

25-kleuren pipetteren is geen sinecure

Van vloeibare naar droge reagentia

Vloeibare reagentia

- Batch en lot variatie
 - Titratie
 - PMT/Compensatie
 - Adaptatie
- Stabiliteit na expiratie datum
- Stabiliteit na opening van vial
- Dood volume
- Issue in ISO certificatie
- Etc.

Vloeibaar versus Droog

**DuraClone™ 10-colour panel
(T-cel en NK-cell populations)**

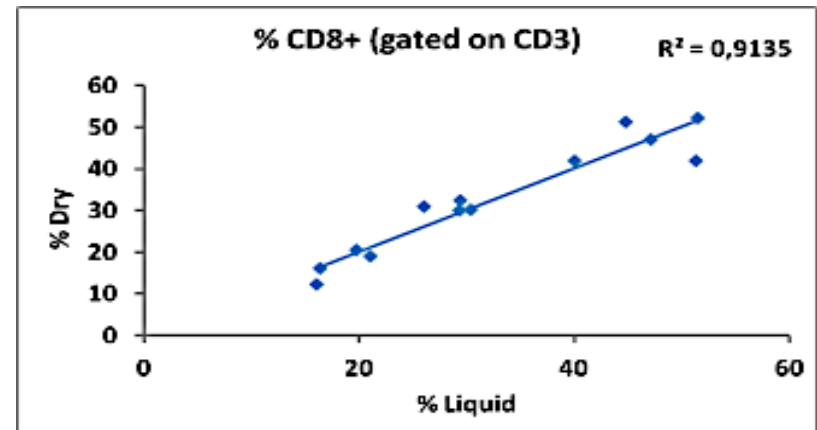
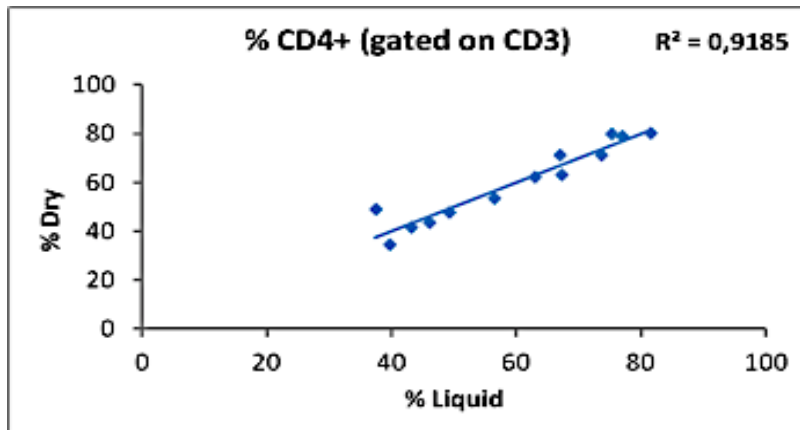
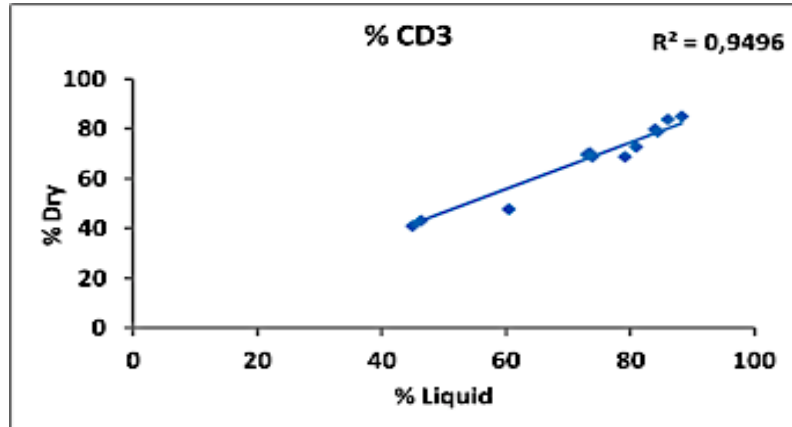
FITC	PE	ECD	PECy5.5	PECy7	APC	APC A700	APC A750	Pac B	KrO™
CD45RA	CD7	CD45RO	CD5	CD27	CD56	CD8	CD3	CD4	CD45

Getest in 20 samples

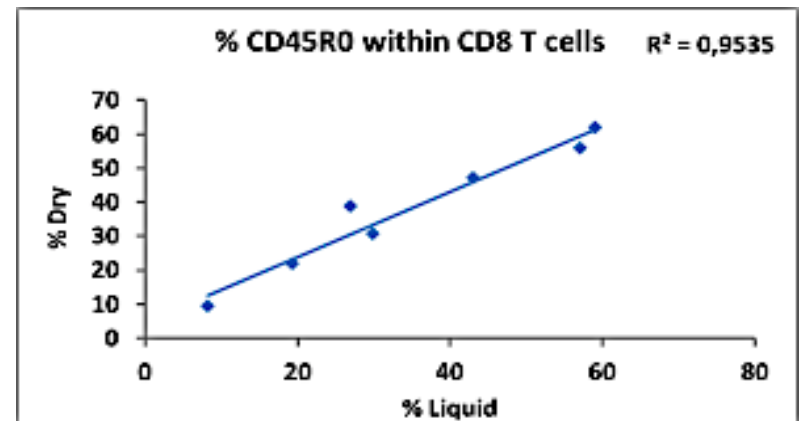
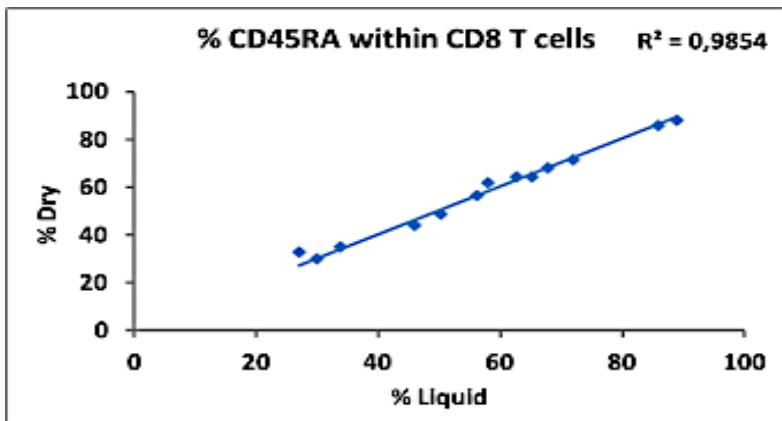
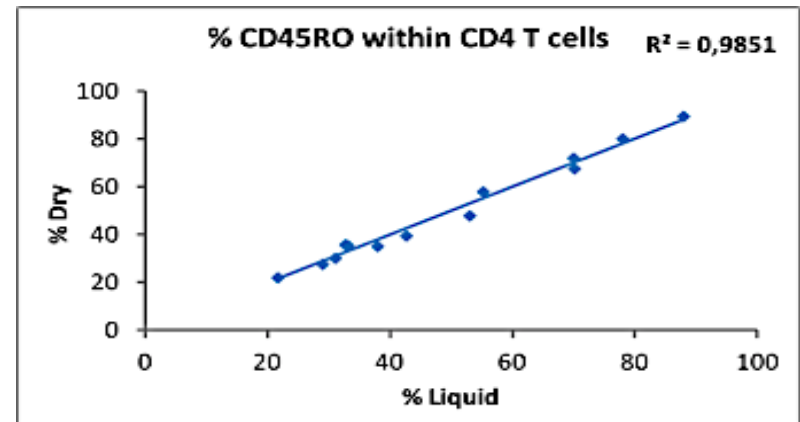
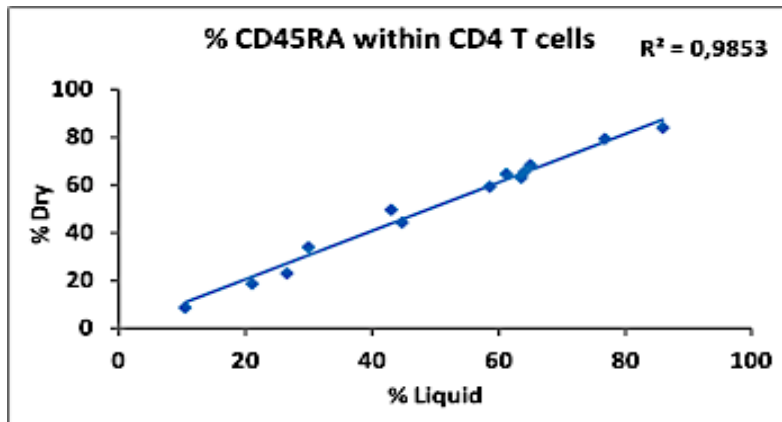
Geanalyseerd op 3 Navios instrumenten

Resultaten geëvalueerd in Kaluza

Vergelijking liquid versus Dry



Vergelijking liquid versus Dry



Maar wat nog meer??

Ontwikkelingen in analysis:

Exclusie van dode cellen

Invloed van dode cellen op kloongrootte in PNH



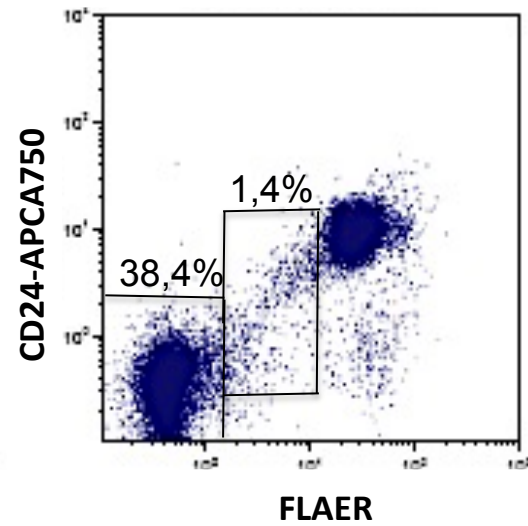
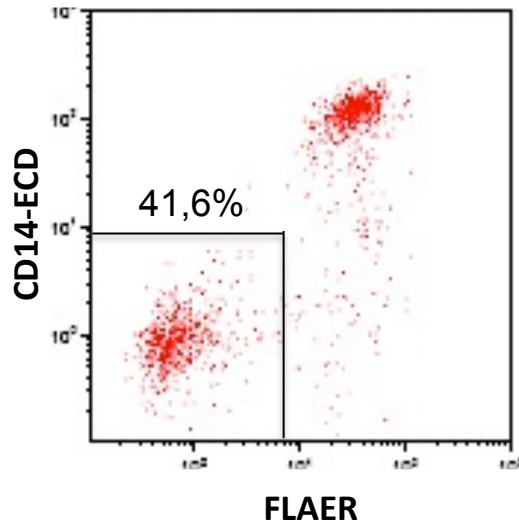
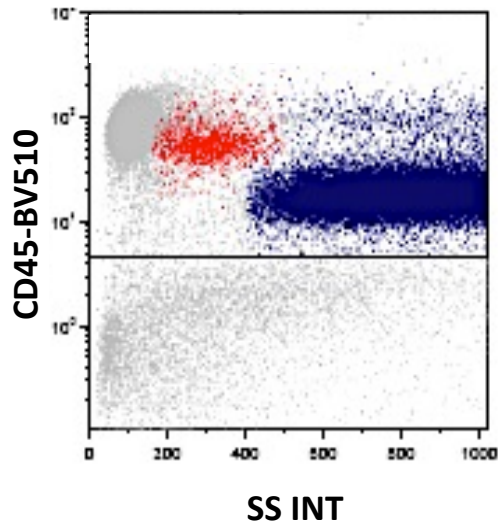
conventionele assay geen correctie voor dode cellen

MAAR

**Dode cellen kunnen niet-specifieke binding van MoAbs
en andere eiwitten geven**

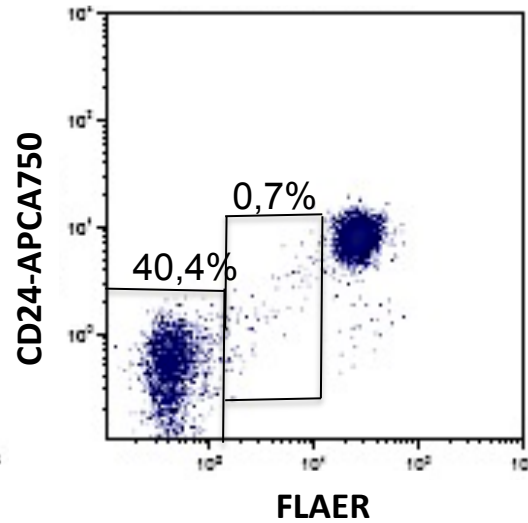
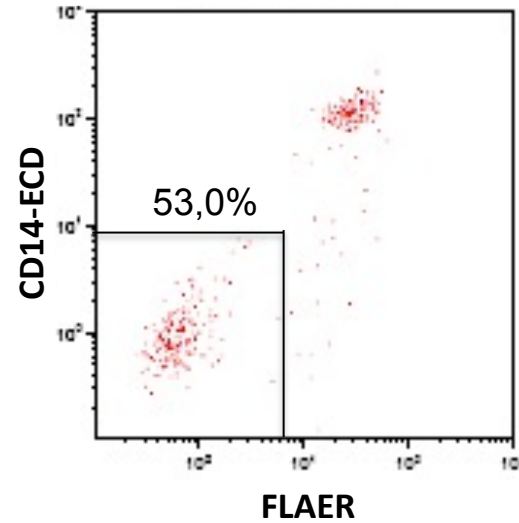
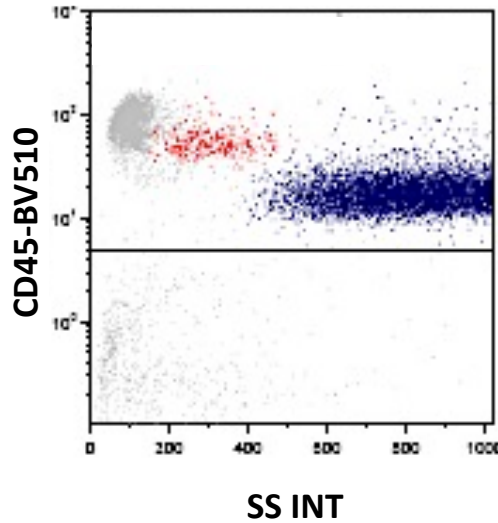
**Daarom dood-levend kleuring noodzakelijk:
bijv. 7-AAD, DRAQ7**

Invloed van dode cellen: grote PNH kloon



Zonder
DRAQ7

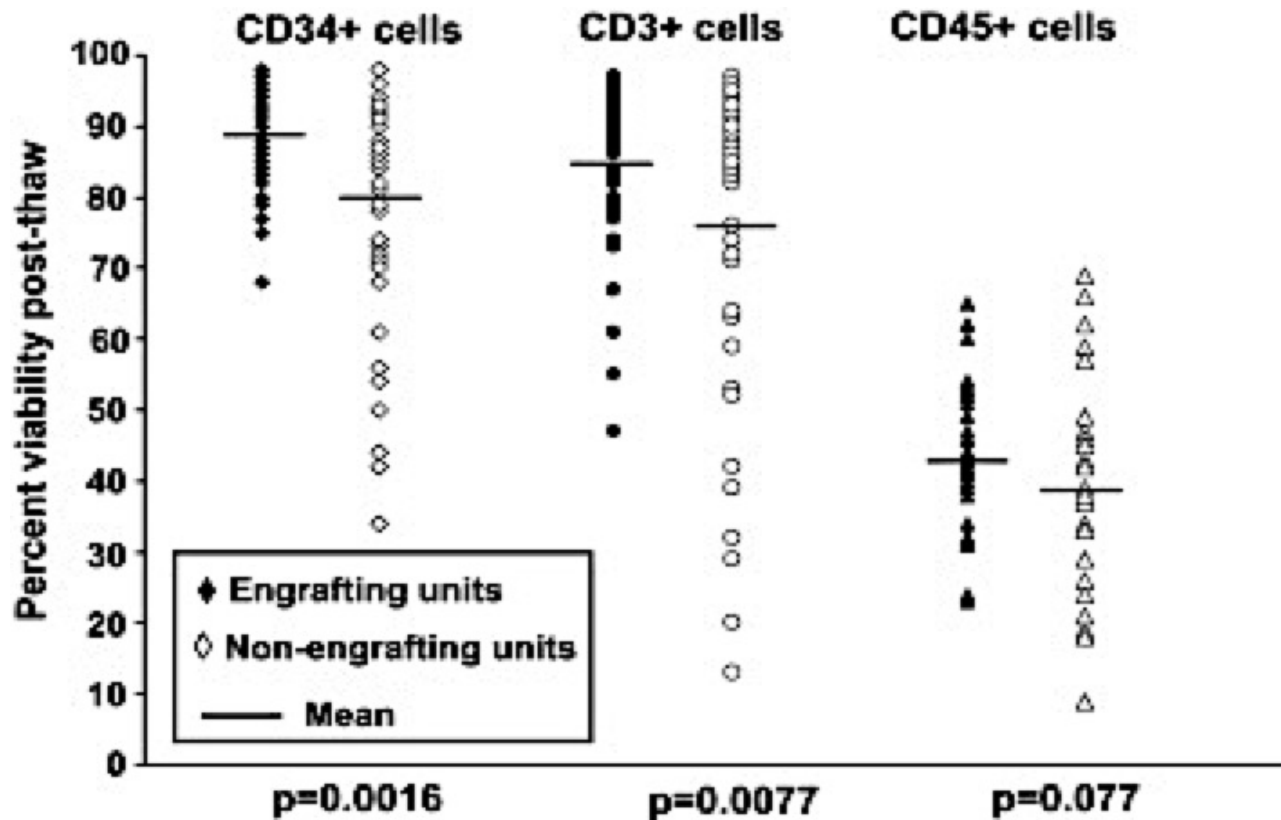
B



Met
DRAQ7

Lage CD34⁺ Viabiliteit veroorzaakt een lage kans op Engraftment na Navelstrengbloed transplantaties

Transplantaten met <75% viabiliteit geven sterk verminderde kans op engraftment



Scaradavou et al.
Transplant Biol Blood and Marrow, Transplantation 2010, 16, 4, 500

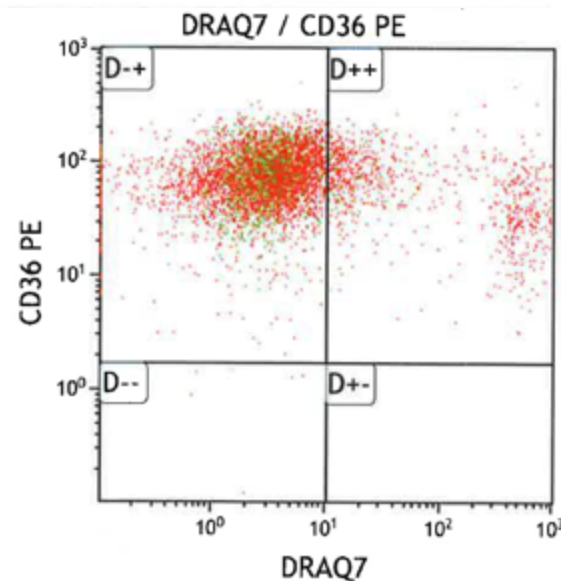
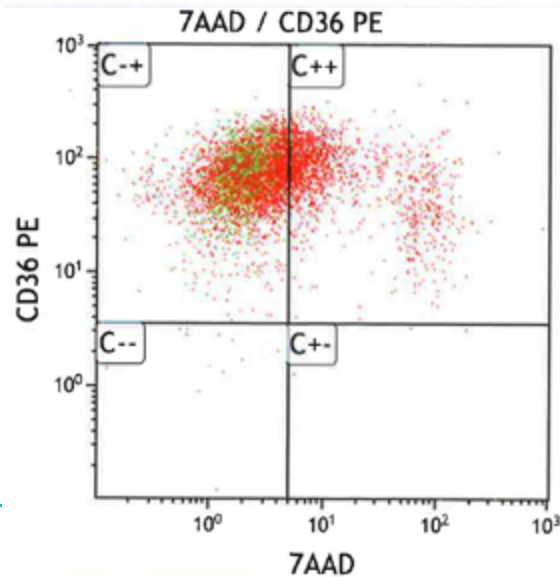
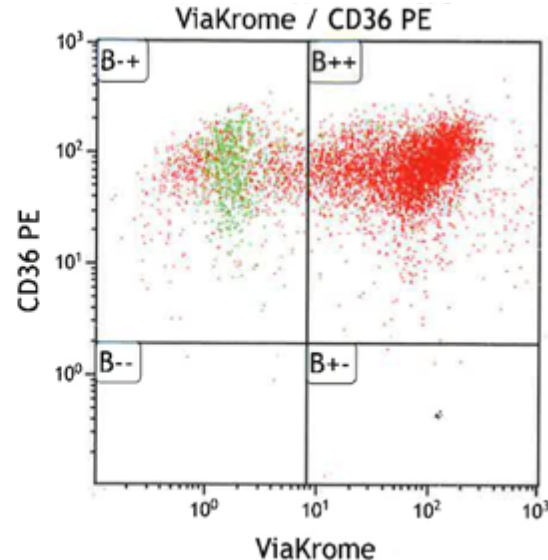
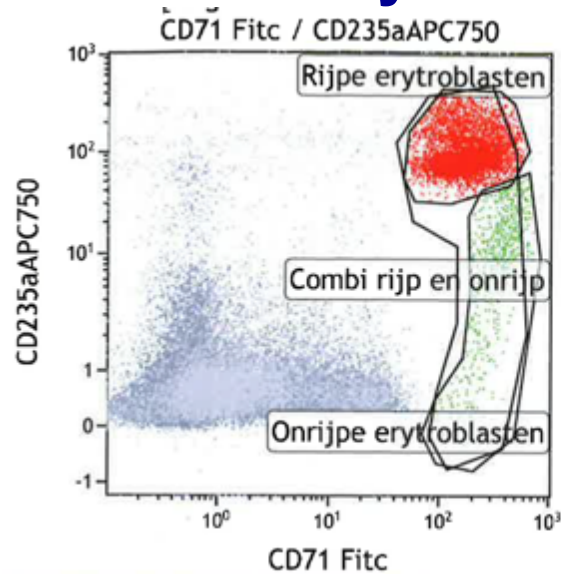
Dood / levend kleurstoffen

- **DNA binders**
 - PI, 7-AAD (Lange historie: 7-AAD en PI)
 - Sytos dye, DRAQ7: Easy to use aan einde van kleuring-procedure
 - Beperkt gebruik met fix/perm procedures
- **Amine binders**
 - Zombie dyes, ViVid, Aqua blue, etc.
 - Impermeabel maar binding aan amine groepen op eiwitten: Levende cellen weinig amines op membraan (dim staining), dode cellen veel (bright staining)
 - Easy to use in gefixeerde cellen
 - Dure reagentia
- **Vrije Thiol binders**
 - Viakrome
 - Idem als amine binders maar;
 - Bindt in de cel en op membraan
 - Oplosbaar in water: Geen DMSO nodig voor oplossen

Conclusie: DNA binders lijken OK maar de Amine binders en vooral thiol binders zijn beter

Viabiliteit kleuring

Gelyseerd beenmerg

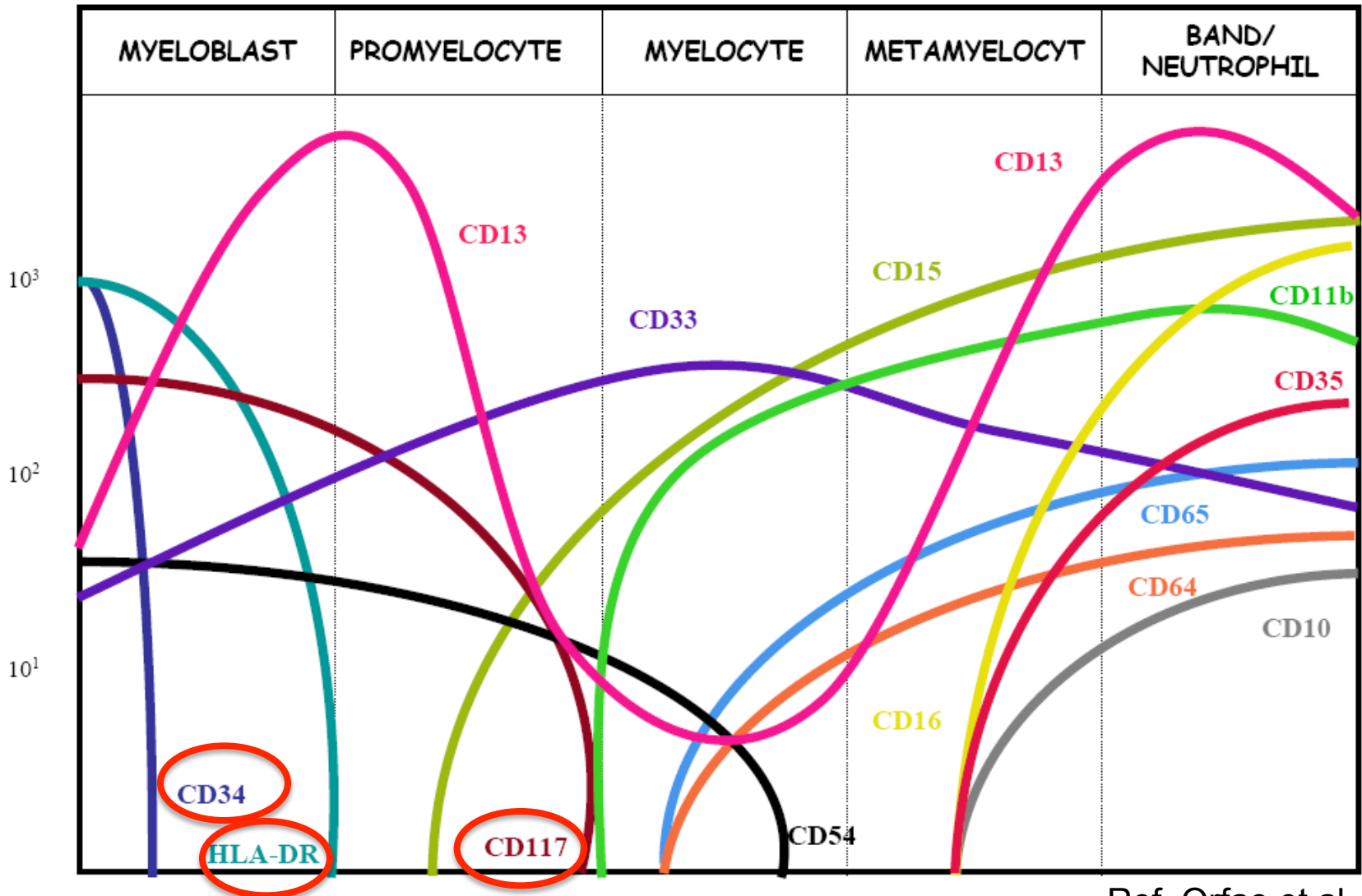


Ontwikkelingen in patroon herkenning krijgt een boost door multi-kleur analyses

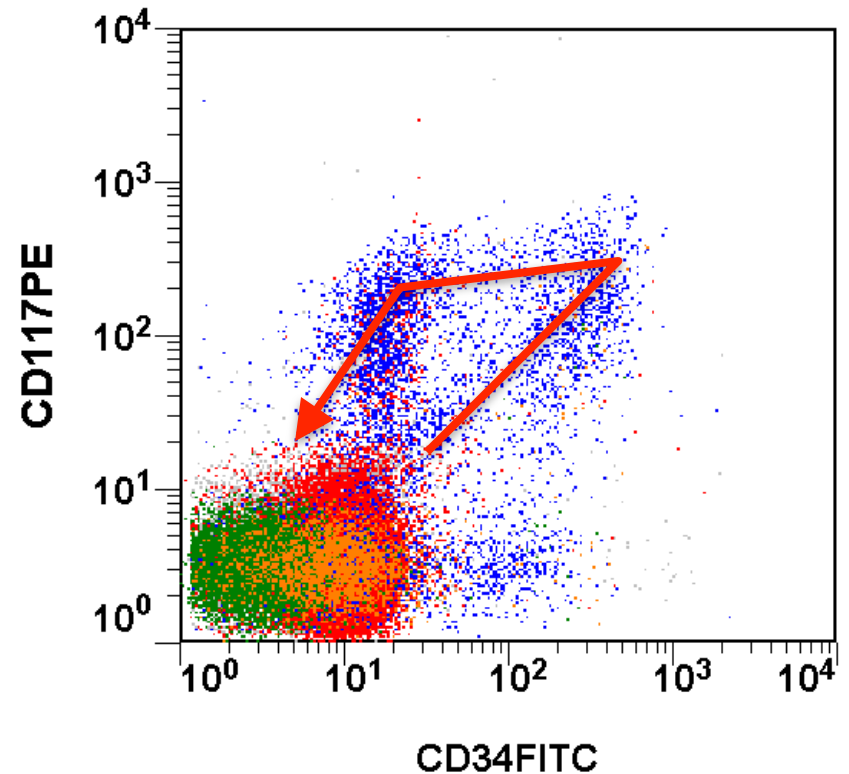
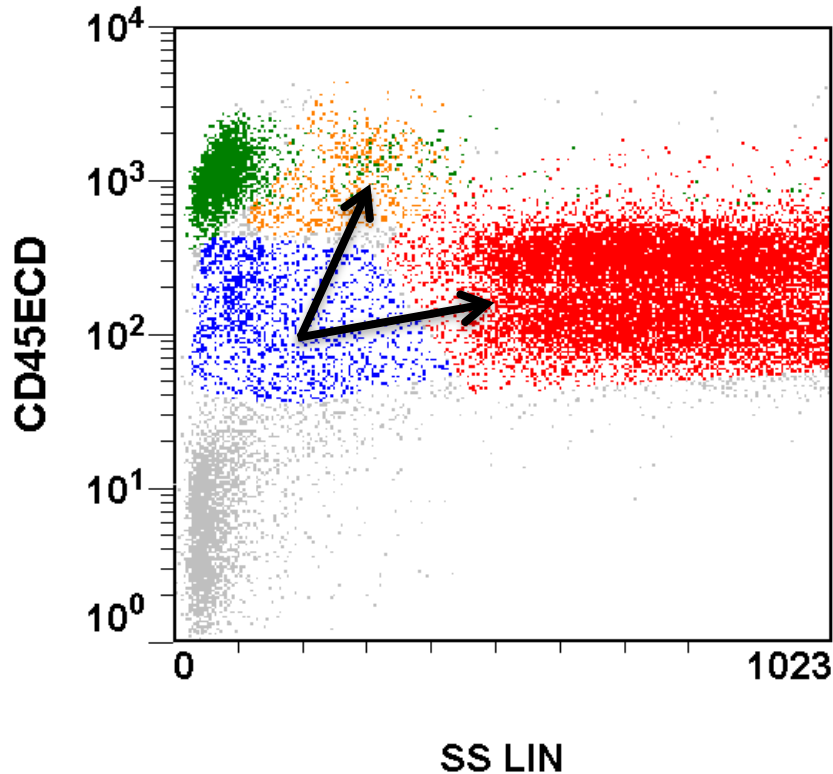
Hoe kan je differentiëren binnen normale cellen en tussen normale en maligne populaties

- **Patroon herkenning:**
 - **Wat is het normale patroon van expressie?**
 - **Wat is het aberrante patroon van expressie?**

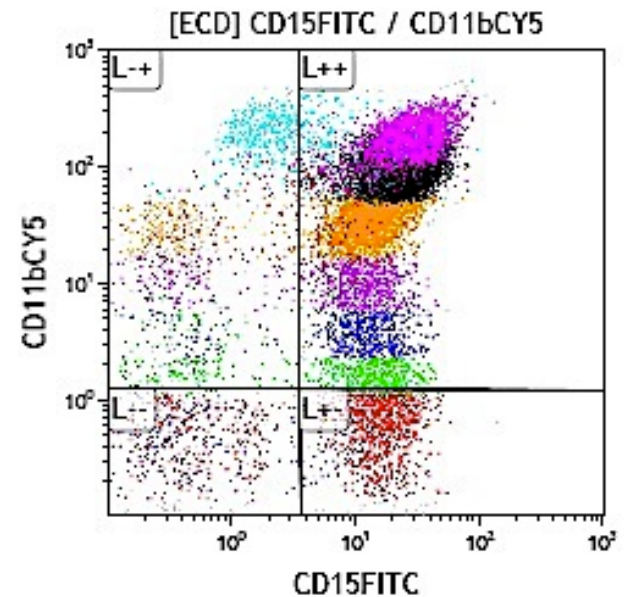
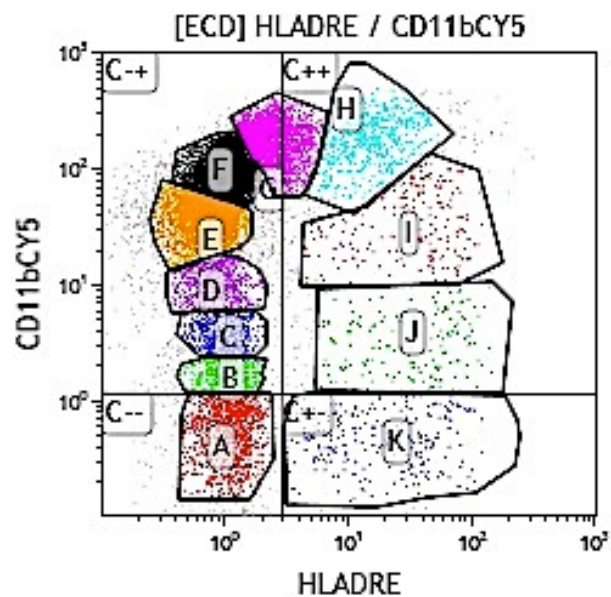
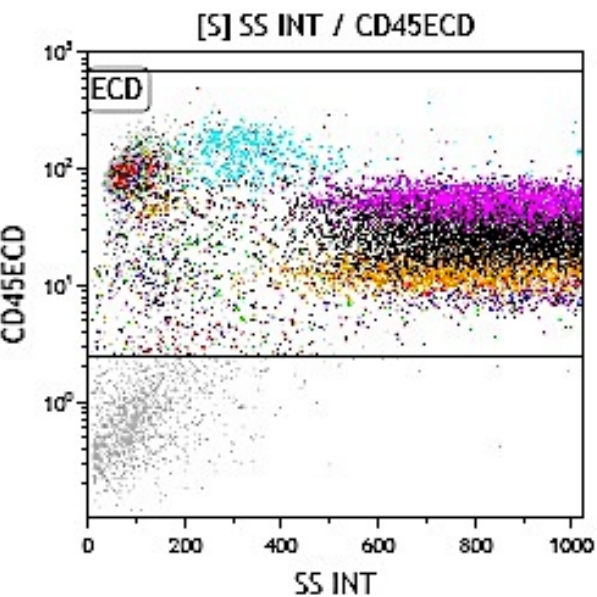
Fenotype veranderingen in de neutrofiele differentiatie lijn



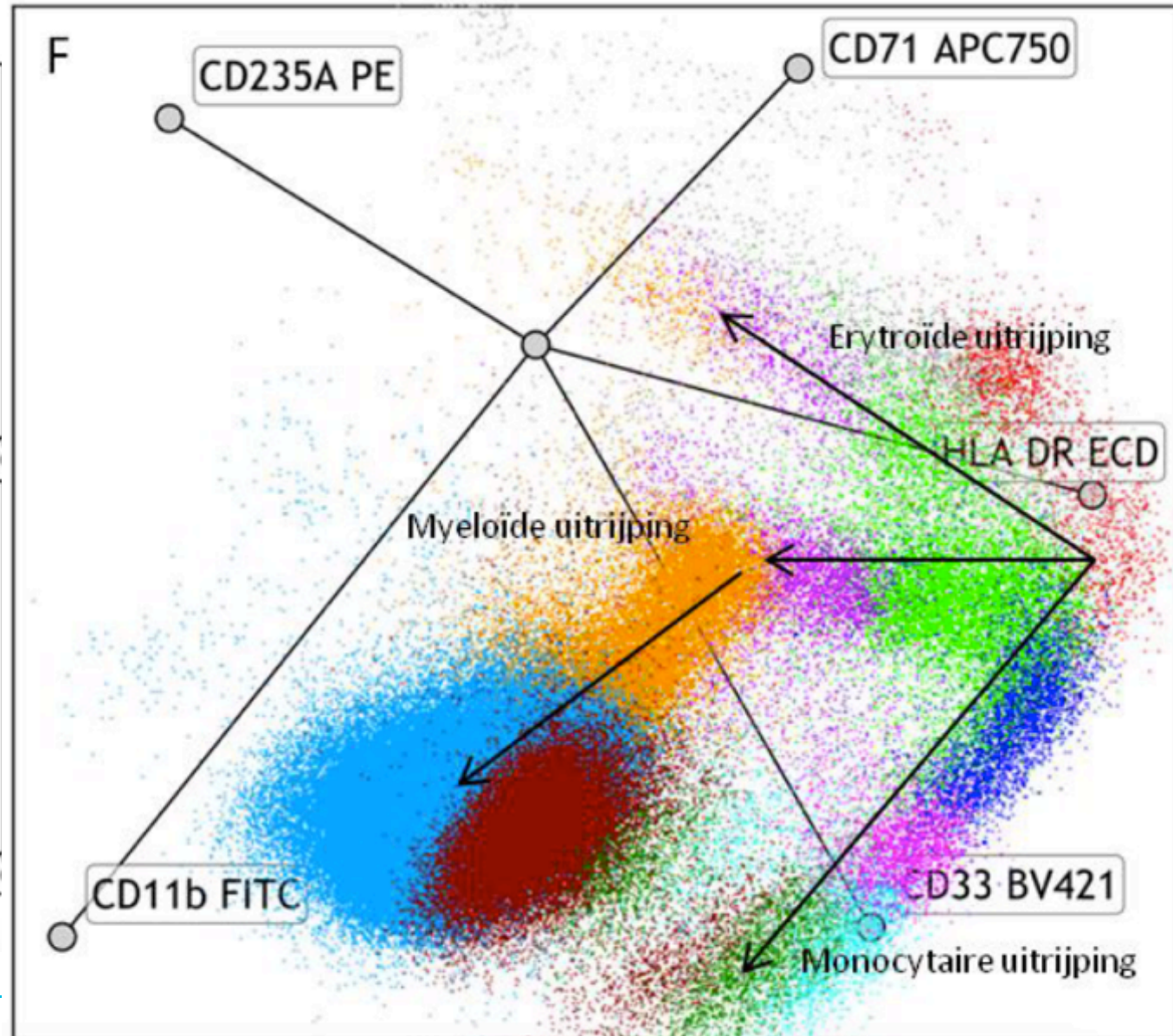
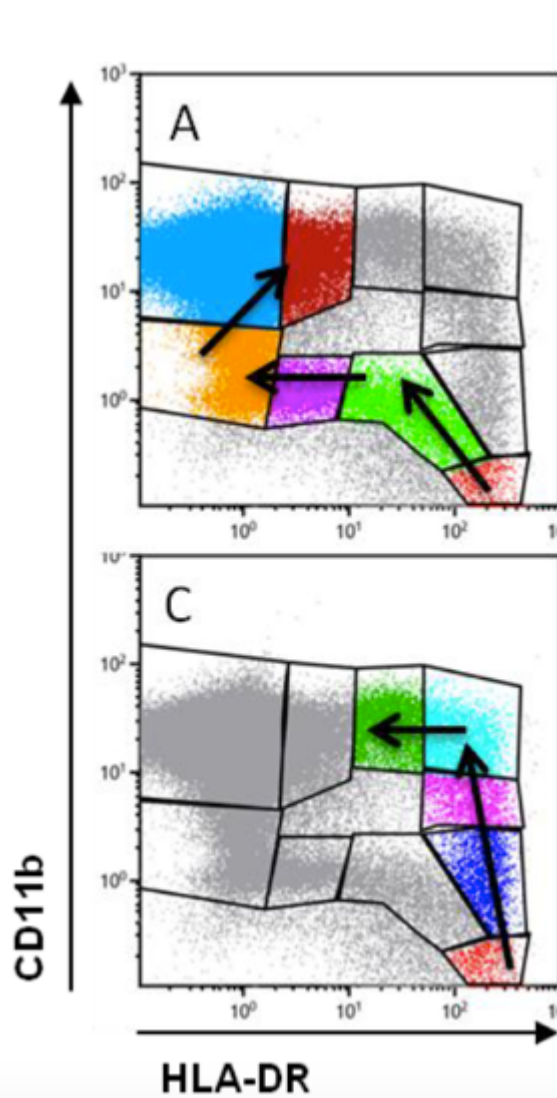
Expressie patroon van CD34 / CD117 in CD45+ populatie (normaal BM)



Expressie patroon van CD11b/CD15/HLA-DR in CD45+ populatie (normaal BM)

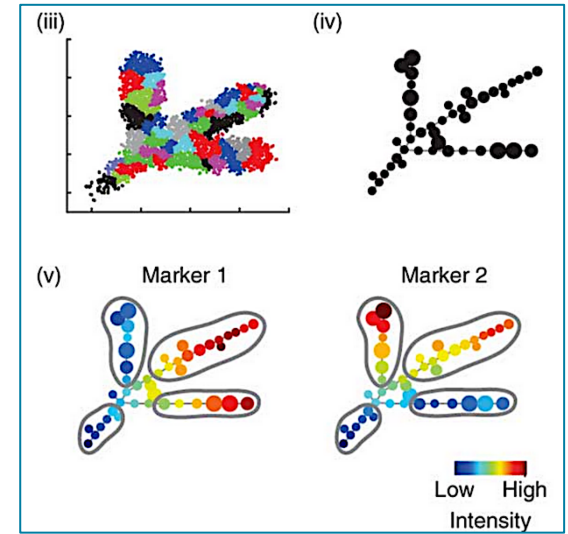
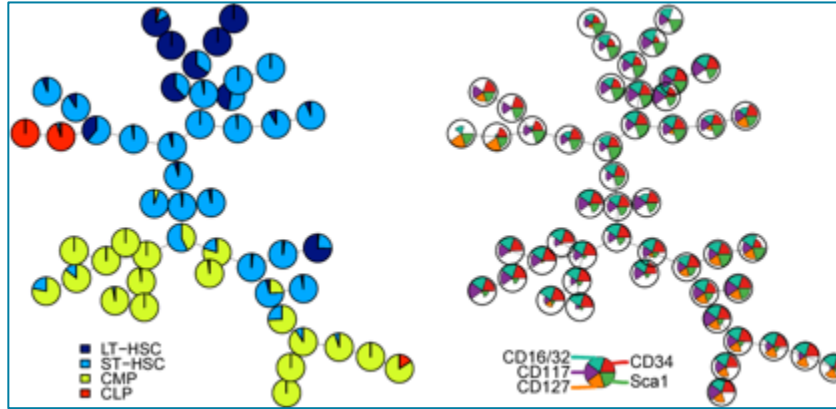


Hematopoïese (Myeloid - Monocytic - Erytroïde)

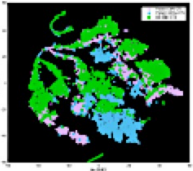


FLWSOME

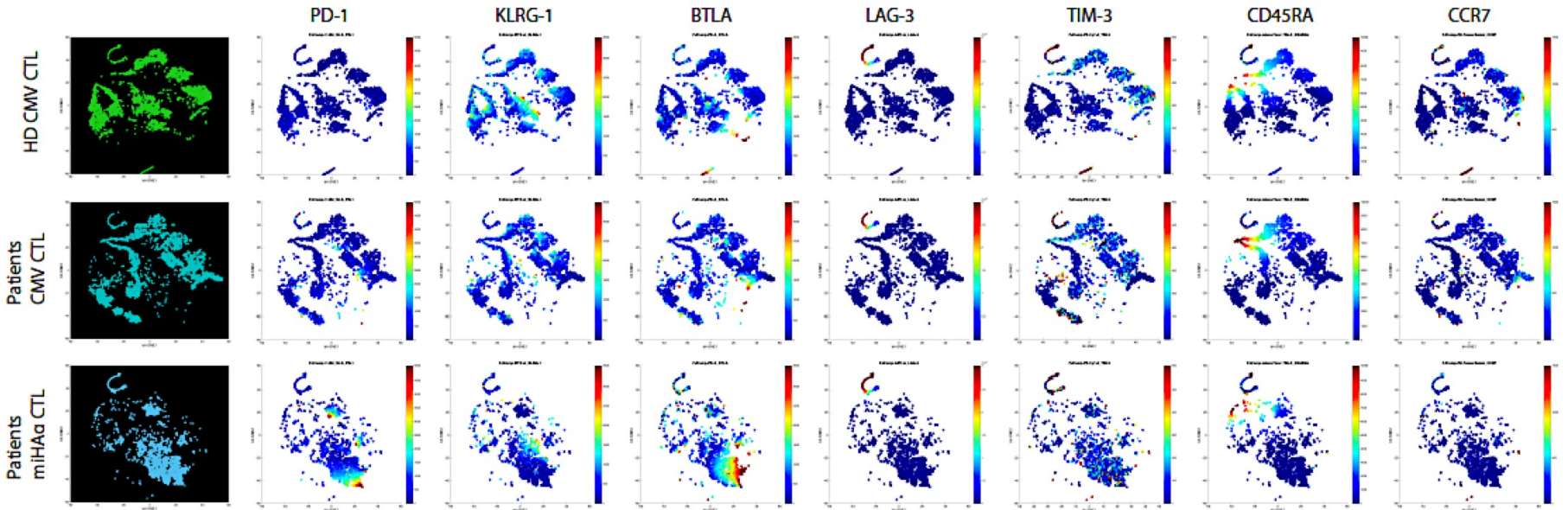
SPADE



HD over pat miHAg
over pat CMV



VISNE



**Flowcytometrie wordt door
multi-kleuren techniek zeer complex**

**Toch maar beperken tot 10-kleuren én
“stapelen (stacken)” van MoAbs??**

***Mogelijkheid om meer MoAbs te
combineren***

“Een alternatieve aanpak: Stacking antilichamen in 1 kleur”

Tot twee

Blue laser (488 nm)					Violet laser (405 nm)		Red laser (638 nm)		
FITC	PE	ECD	PECy5.5	PECy7	PB	KO	APC	APC-A700	APC-A750
CD34	CD7	CD10	CD4	CD117	CD15	CD45	CD3	CD8	CD19
Igkappa	Iglambda			CD56	CD20		CD33		

A New 10-Color Monoclonal Antibody Panel for Polychromatic Immunophenotyping of Small Hematopoietic Cell Samples. *Preijers et al. Cytometry 81A, 453, 2012*

Blue laser (488 nm)					Violet laser (405 nm)		Red laser (638 nm)	
FITC	PE	ECD	PECy5.5	PECy7	PB	PO	APC	APC-H7
CD8	CD56		CD5	CD19	CD20	CD45	CD3	CD38
Iglambda	Igkappa			TCRγδ	CD4			

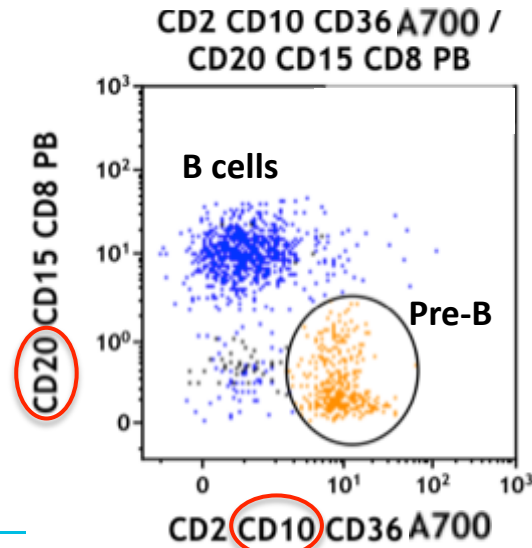
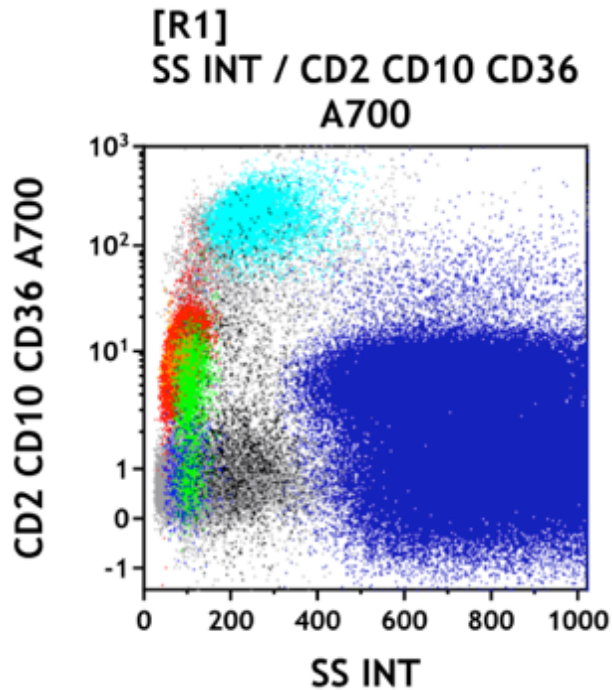
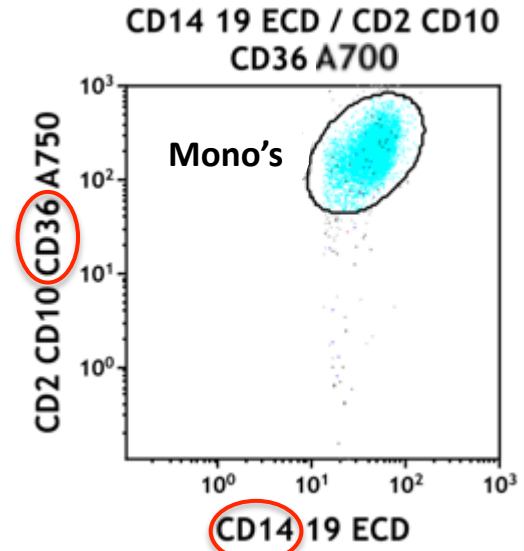
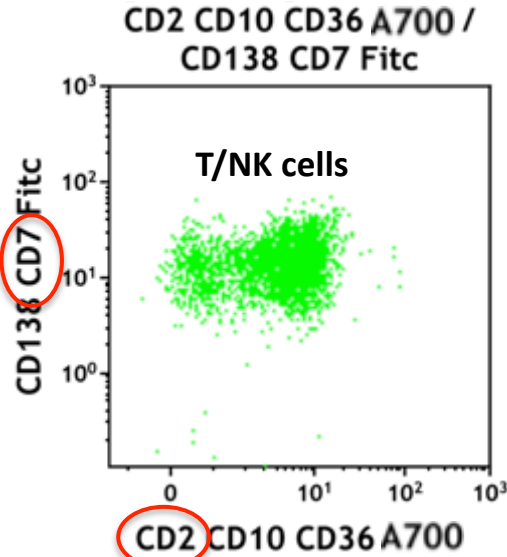
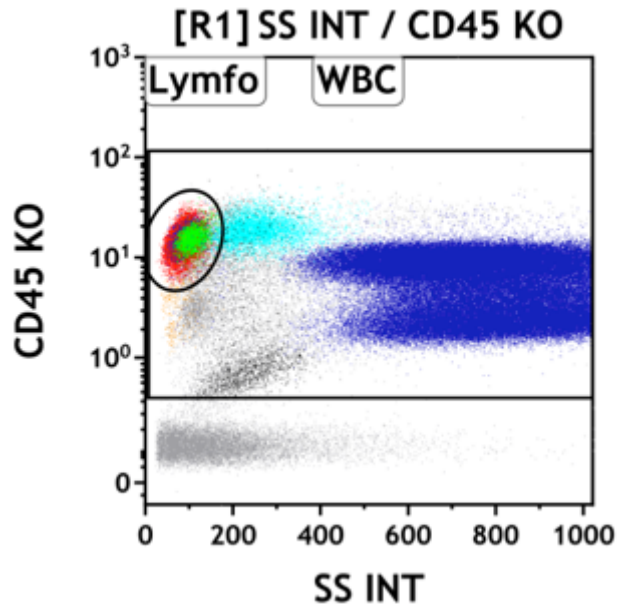
Euroflow, Lymphoid Screening Tube (LST)

Tot drie

Blue laser (488 nm)					Violet laser (405 nm)		Red laser (638 nm)		
FITC	PE	ECD	PECy5.5	PECy7	PB	KO	APC	APC-A700	APC-A750
CD138	CD56	CD19	CD33	CD4	CD8		CD117	CD10	CD3
CD7	Iglambda	CD14	CD5	CD34	CD20	CD45	Igkappa	CD36	
	CD16				CD15			CD2	

A new 10-color Panel with 21 MoAbs for Polychromatic Immunophenotyping of Small Cell Samples. *Poster presentation ESCCA2018.*

Voorbeeld: 2-combi's van 2 of 3 MoAbs in 1 kanaal



Vraagstelling

- Wat is het aantal MoAbs dat gestapeld kan worden in 1 kleur?
- Is het mogelijk om het gestapeld aantal te combineren in een panel in meer kanalen?

Doel:

1-tube assay voor snelle screening van beenmerg/bloed samples als eerste-fase voor detectie van aberrante contaminatie

Populatie selectie door multi-MoAbs of dump kanaal

FITC	PE	PerCP-CY5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	BV421	V500c
CD45RA	CLL-1 TIM-3 CD7 CD11b CD22 CD56	CD123	CD33	CD38	CD44	CD34	CD45

A simple one-tube assay for immunophenotypical quantification of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Zeijlemaker et al. Leukemia 2016, 30, 439.*

FITC	PE	APC	APC-A700	PB	KO
CD4 CD14 CD16 CD19	Tetramer	Tetramer	CD8	Sytox b.	CD45

Association of disparities in known minor histocompatibility antigens with relapse-free survival and graft-versus-host-disease after allogeneic stem cell transplantation. *W. Hobo et al. Biol.BMT 2013, 19, 274.*

“An alternative approach: Stacking antibodies in one color”

MAAR

**Is het mogelijk om een panel te ontwikkelen
van gestapelde MoAbs met
>3 verschillende MoAbs in 1 kleur voor
identificatie van verschillende antigenen en/
of verschillende celpopulaties**

**Aanpak lijkt simpel en realistisch!
Echter.....**

!!Balancing-Balancing-Balancing!!

Reeds geteste panel (2-combi's van 6 MoAbs)

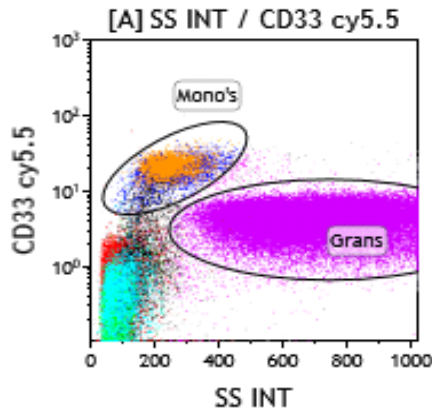
Stacking

Gating

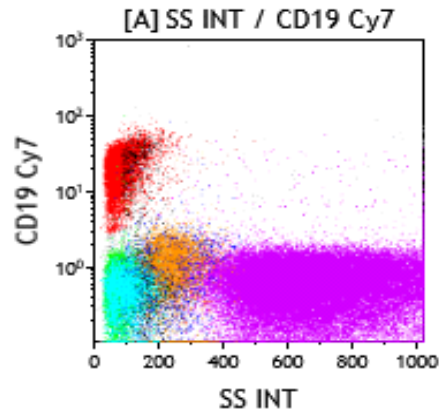
FITC	PE	ECD	PE-Cy5.5	PE-Cy7		APC-A750		Krome Orange
CD8	CD4	CD38	CD33	CD19		CD3		CD45
CD14	CD36							
CD20	CD10							
CD34	CD117							
CD71	CD15							
CD138	CD56							

Tot 2-combi's van 6 MoAb in dezelfde kleur

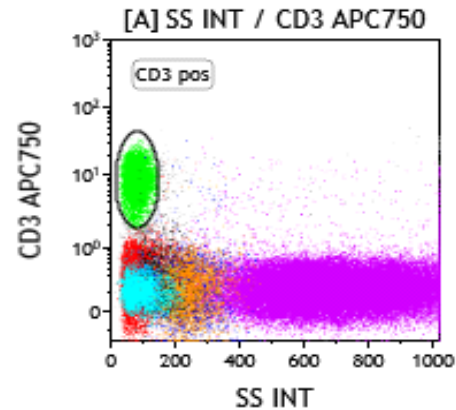
Gating MoAbs



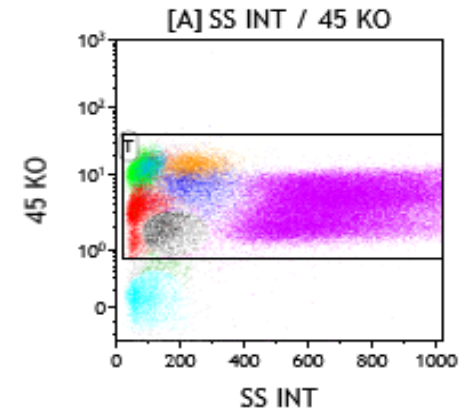
Gate	Number	%Total	%Gated
All	104.555	81,02	100,00
Grans	68.781	53,30	65,78
Mono's	7.003	5,43	6,70



Gate	Number	%Total	%Gated
All	104.555	81,02	100,00

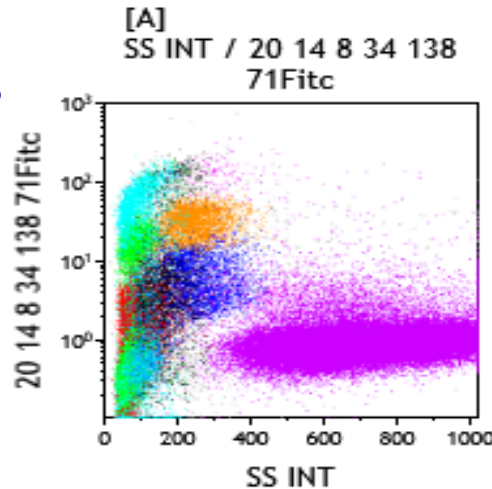


Gate	Number	%Total	%Gated
All	104.555	81,02	100,00
CD3 pos	9.263	7,18	8,86

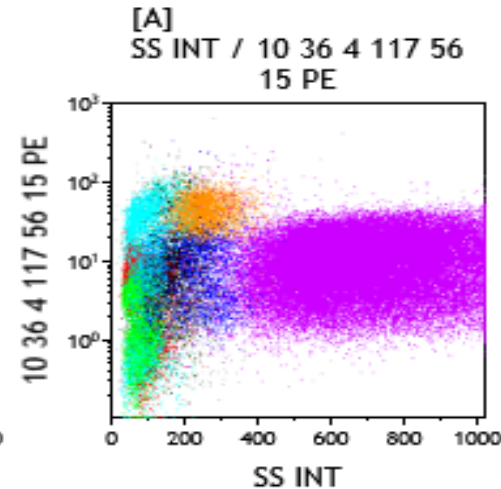


Gate	Number	%Total	%Gated
All	104.555	81,02	100,00
T	100.346	77,75	95,97

Targeting MoAbs



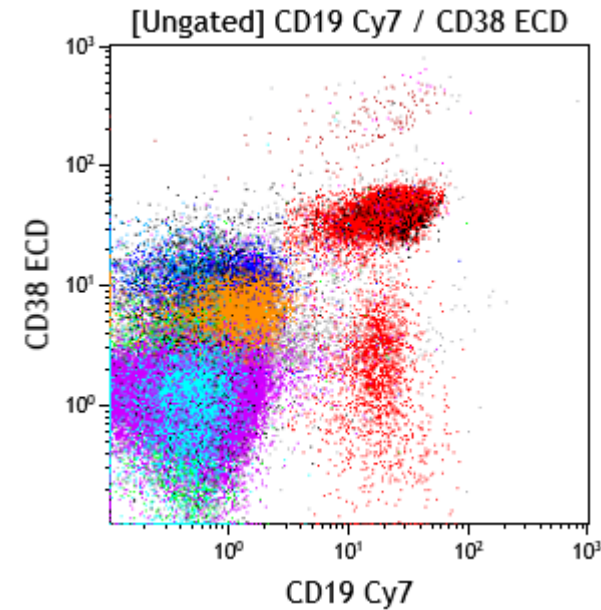
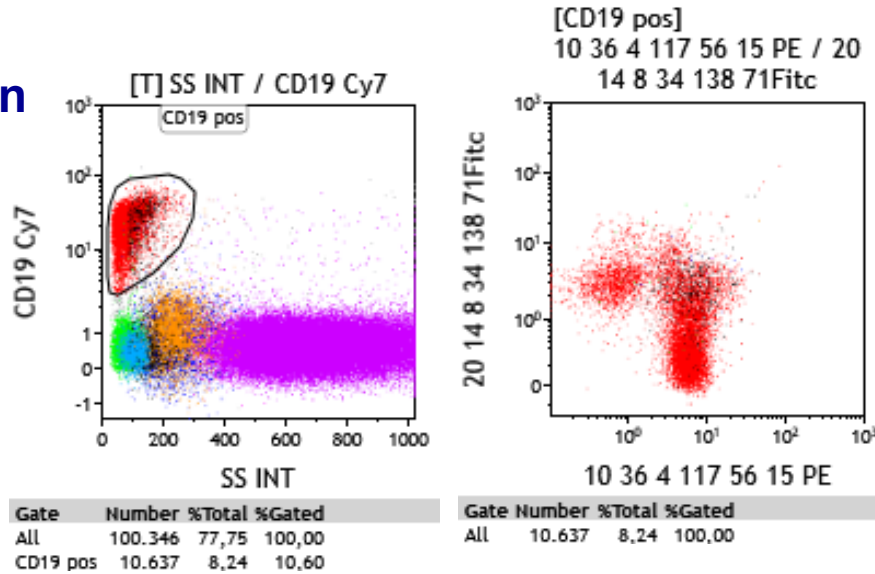
Gate	Number	%Total	%Gated
All	104.555	81,02	100,00



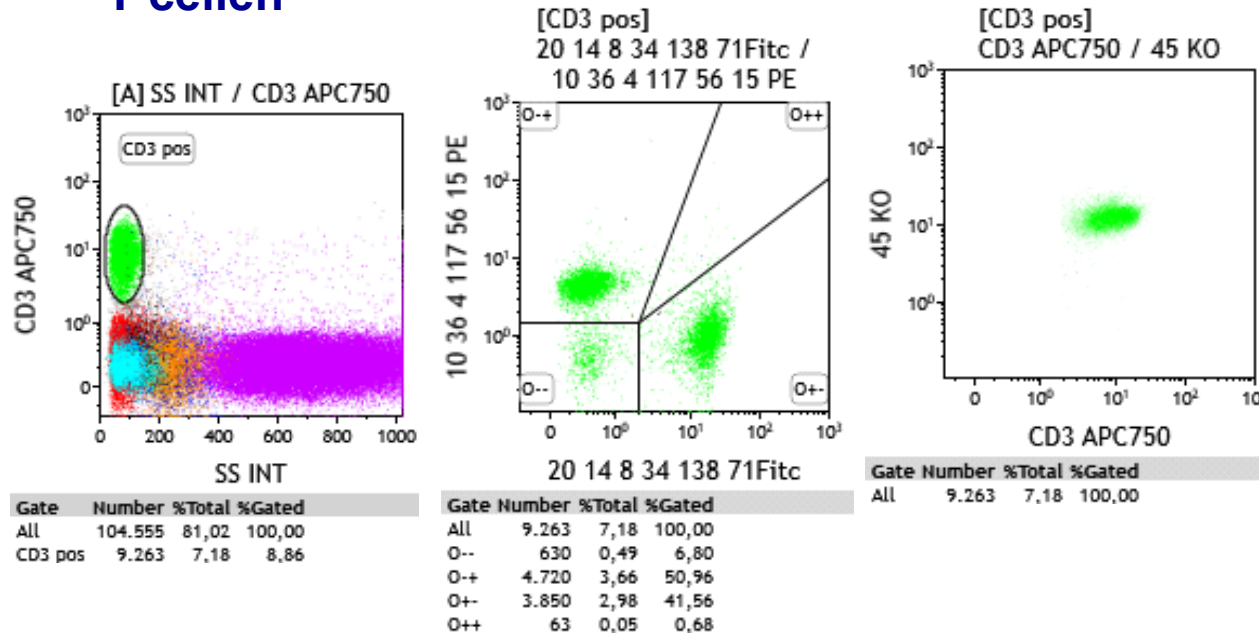
Gate	Number	%Total	%Gated
All	104.555	81,02	100,00

Tot 2-combi's van 6 MoAb in dezelfde kleur

B cellen

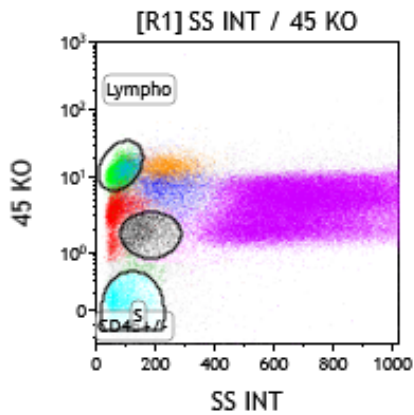


T cellen

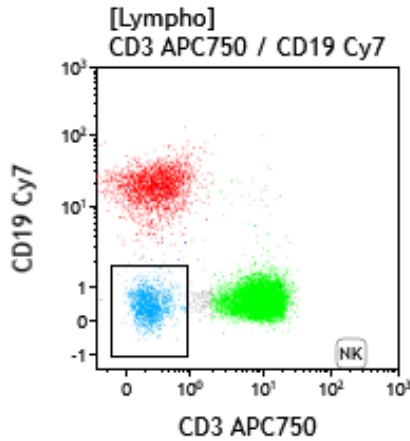


Tot 2-combi's van 6 MoAb in dezelfde kleur

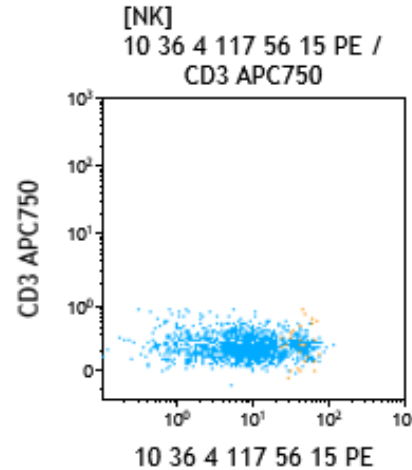
NK cellen



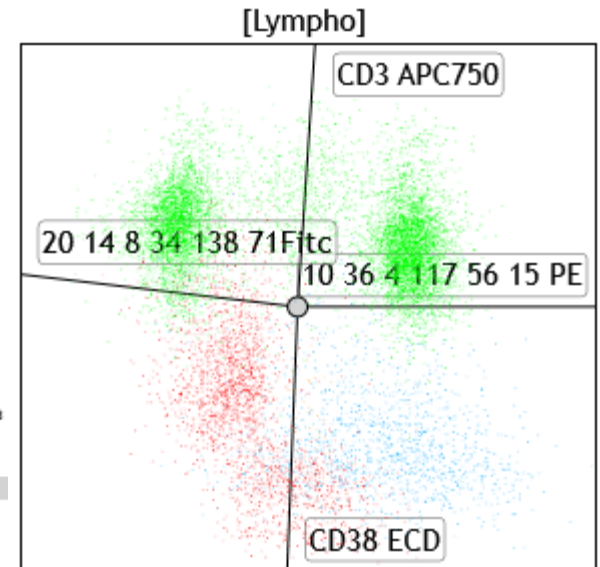
Gate	Number	%Total	%Gated
All	125.047	96,89	100,00
CD45+/-	2.386	1,85	1,91
Lympho	12.927	10,02	10,34
S	3.212	2,49	2,57



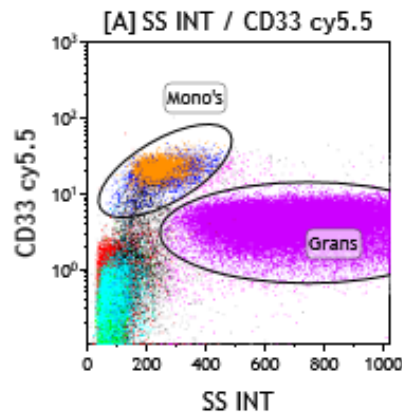
Gate	Number	%Total	%Gated
All	12.927	10,02	100,00
NK	1.379	1,07	10,67



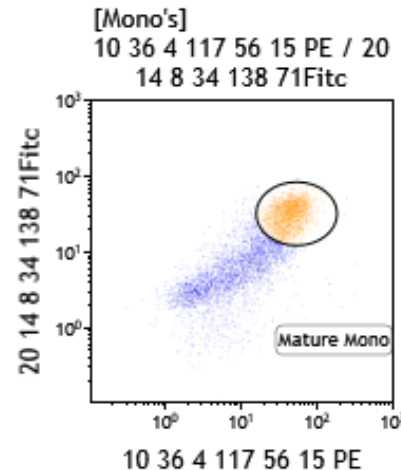
Gate	Number	%Total	%Gated
All	1.379	1,07	100,00



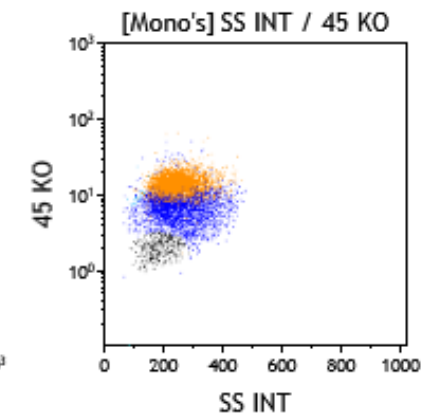
Monocyten



Gate	Number	%Total	%Gated
All	104.555	81,02	100,00
Grans	68.781	53,30	65,78
Mono's	7.003	5,43	6,70

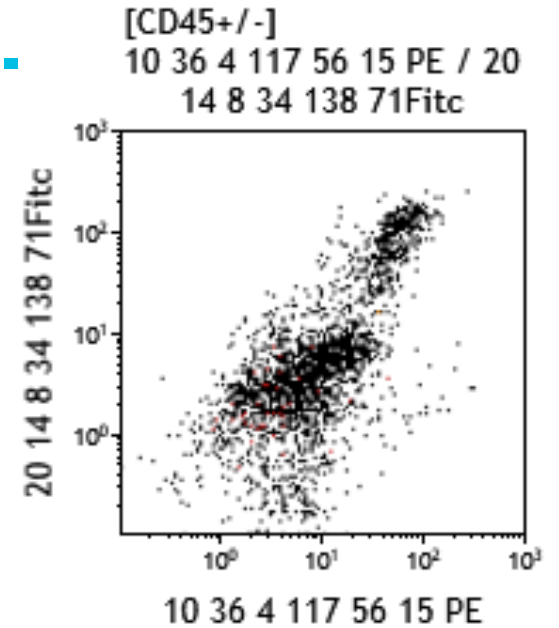
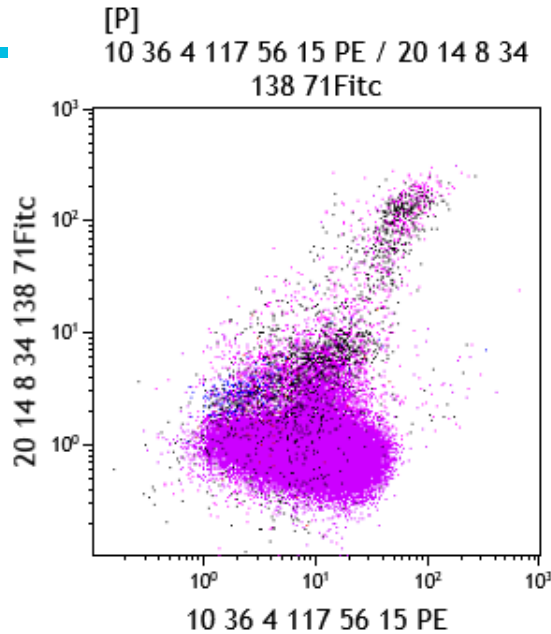
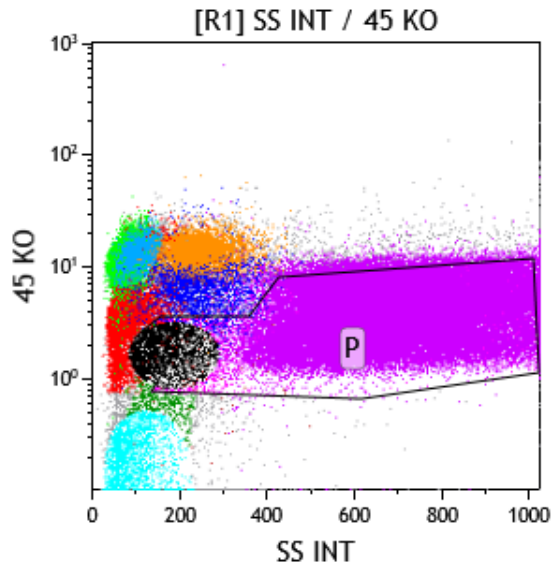


Gate	Number	%Total	%Gated
All	7.003	5,43	100,00
Mature Mono	3.152	2,44	45,01

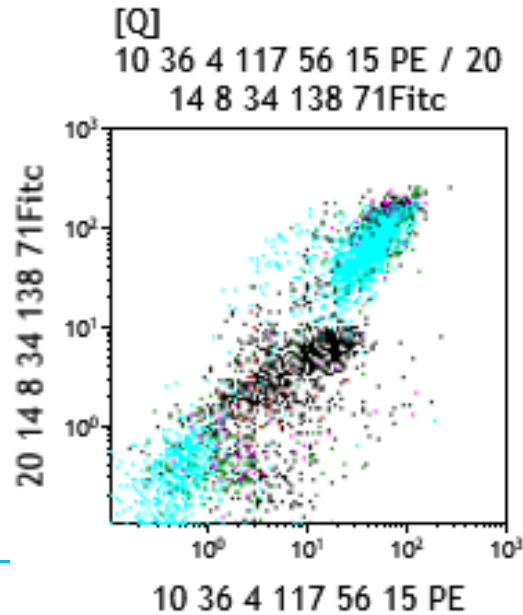
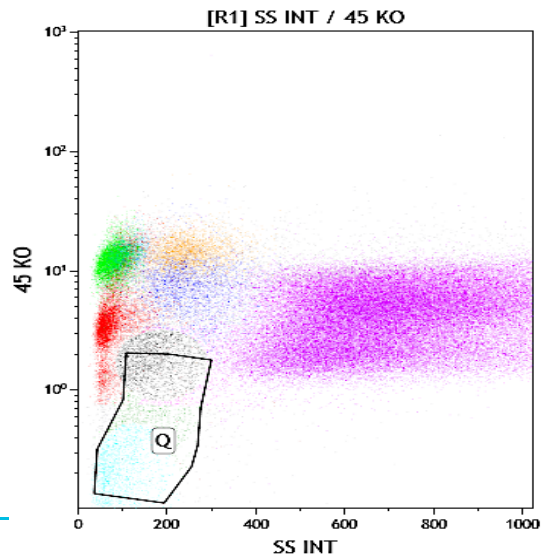


Gate	Number	%Total	%Gated
All	7.003	5,43	100,00

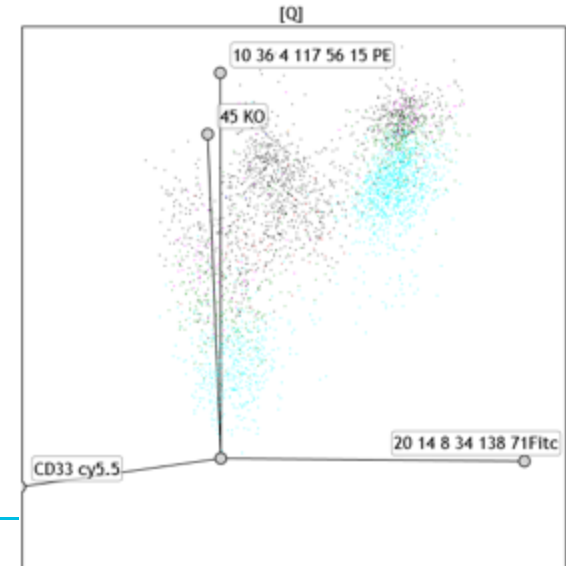
Myeloide lineage



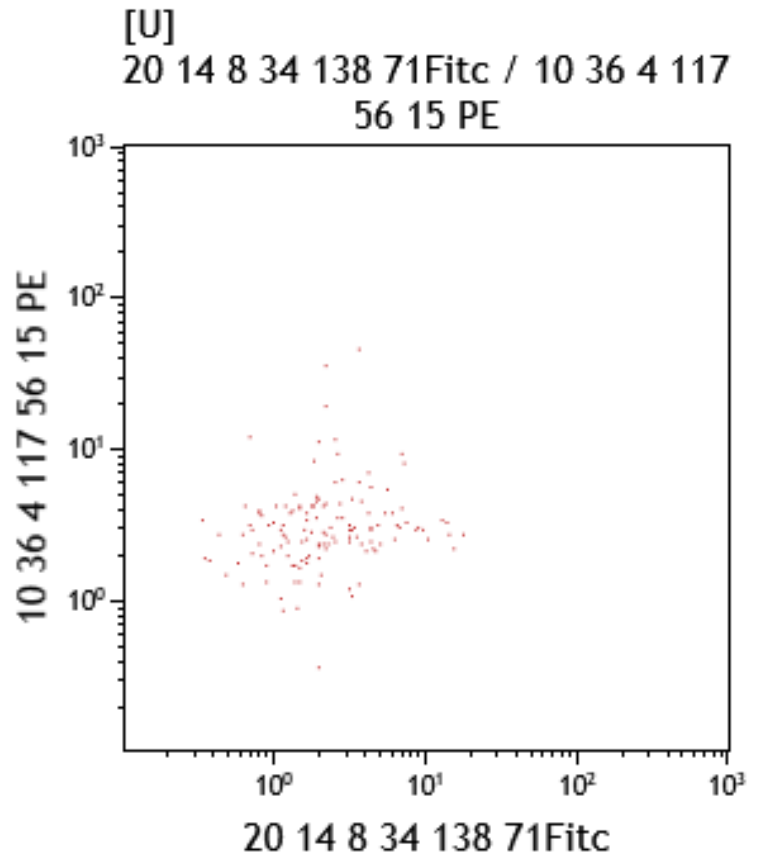
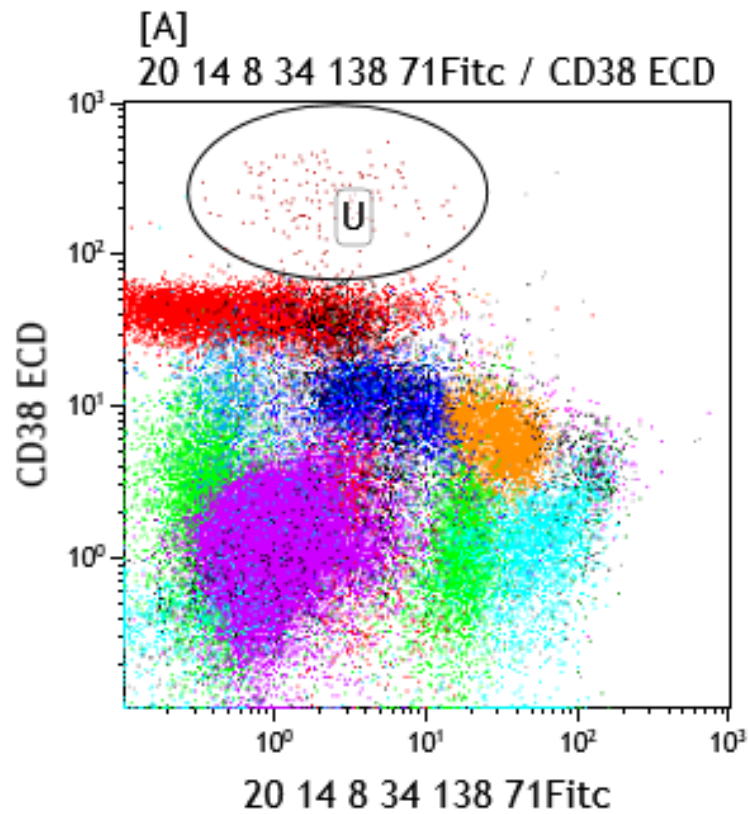
Gate Number	%Total	%Gated
All	2.386	1,85 100,00



Gate Number	%Total	%Gated
All	3.478	2,69 100,00



Plasma cellen



Conclusie

**Stapelen van MoAbs is mogelijk en
betrouwbaar MAAR ALLEEN als de
correcte gating procedure
wordt gevolgd**

Overall conclusie:

Flowcytometrie IFT springlevend en zeker niet uit-ontwikkeld.
IFT heeft een **gouden en spannende** toekomst.

Waar gaan we naar toe in de diagnostiek?

- 10/13-kleuren met stapelen

Maar in 10-15 jaar?

- 20-25-kleuren mits conjugaten aanwezig
 - Spectraal
- Droge MoAbs in 20-25 kleuren buizen

We moeten ons realiseren

- * **Complexiteit neemt met aantal MoAbs log-gewijs toe**
 - Uitdaging maar voor dagelijkse IFT
 - Meer automatisering, meer analyse programma's en meer protocollair noodzakelijk
-





WELKOM IN NIJMEGEN

De oudste stad van Nederland (>2000 years)



NOVIOMAGUS = Nieuwe wegen