2. Treffen der Arbeitsgruppe «Durchflußzytometrie» der DGTI-Sektion «Monoklonale Antikörper, Gentechnik» am 23.8.1995 in Frankfurt/Main

Infusionsther Transfusionsmed 1996;23:115-116

Qualitätskontrolle durchfluß-zytometrischer Meßverfahren mittels fluoreszenter Partikel («beads»)

H.-G.		Höfft
G.		Schmidtke

^aKlinik für Hämatologie/Onkologie, Zentrum für Innere Medizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg ^bAbteilung für Hämatologie, Zentrum für Innere Medizin, Universität Essen

Dr. med. H.-G. Höfft, Klinik für Hämatologie/Onkologie, Universitätsklinikum, Leipziger Straße 44, D-39120 Magdeburg (Deutschland)

Der Einsatz der Durchflußzytometrie in der Routine bedingt zunehmend qualitätssichernde Maßnahmen bezüglich der Gerätekalibrierung, Datenakquisition und -analyse. Der Standardisierung der Datenakquisition und -analyse wird in Zukunft durch die Entwicklung der Konsensusprotokolle für die jeweiligen Anwendungsgebiete zumindest im nationalen Raum Rechnung getragen. Diese Protokolle sollten zu einer weitgehenden Übereinstimmung der Meßergebnisse im Sinne einer «positiven» oder «negativen» Reaktion mit dem empfohlenen Antikörper-Panel führen. International wird aber darüber hinaus die quantitative Analyse, zum Beispiel der Parameter «Fluoreszenzintensität» oder «Rezeptordichte», zunehmend in den Vordergrund gestellt [1]. Berichte über die Korrelation der Antigendichte verschiedener Marker (z.B. CD10, CD45) mit der Prognose maligner hämatologischer Erkrankungen [2] sowie der Detektion residueller Tumorzellen über unterschiedliche Expression von Antigenen [3] weisen auf die Bedeutung für die Klinik. Diese Form der Datenanalyse setzt allerdings eine valide und reliable Gerätekalibrierung voraus, eine Forderung, die im Rahmen der Etablierung der Zulassungsverfahren für diagnostische Testsysteme auch auf europäischer Ebene für die Standardisierung zellulärer Meßsysteme gestellt wird. Der Einsatz definierter fluoreszenter Partikel («beads») als Standard zur geräte- und anwenderunabhängigen Kalibrierung ermöglicht die Angabe der Fluoreszenzintensitäten als Vergleichswert für verschiedene Laboratorien [4]. Diese Kalibrierung muß für den Anwender schnell, einfach und zuverlässig möglich sein und ist ein unbedingter Standard für das durchflußzytometrische Labor.

Es werden im folgenden das Prinzip der Kalibrierung mittels fluoreszenter Partikel, die Vorteile sowie zu bedenkende Einflußfaktoren in der Anwendung dargestellt. Erfreulicherweise stehen mittlerweile für alle in der Routine verwendeten Emissionsspektren entsprechend definierte Partikel zur Verfügung. Unterschiede bestehen in der Art der Partikel (z. B. künstliche oder natürliche Partikel) und der Fluorochrombindung (Fluorochrom-bindende Partikel oder selbständig emittierende Partikel). Grundlage der Gerätekalibrierung mittels fluoreszenter Partikel ist die exakte Definition des gebundenen Fluorochroms pro Einzelpartikel [5]. Es werden zunächst unterschiedlich definierte Mengen gelösten Fluorochroms photometrisch untersucht und die entsprechenden Fluoreszenzintensitäten bestimmt. Dann wird die Fluoreszenzintensität der mit Fluorochrom gebundenen Partikel bzw. der selbstemittierenden

Partikel bestimmt, und es ist möglich, per mathematischem Dreisatz eine Funktion zu erreichen, die einer gemessenen Fluoreszenzintensität eine exakte Menge an gelöstem Fluorochrom über die Intensität des gebundenen Fluorochroms der Partikel zuordnet. Dieser Wert ist definiert als «molecules of equivalent soluble fluorochrome» (MESF) oder «molecule of equivalent fluorochrome» (MEF), in Abhängigkeit des Partikelsystems [6]. Der Vorteil dieses Vorgehens besteht darin, daß durch die definierten fluoreszierenden Partikel ein vergleichbares Fluoreszenzintensitätsmaß entsteht, welches labor- und anwenderunabhängig sein sollte. Die Gerätekalibrierung erfolgt nicht über die Analyse der Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung der Partikel, sondern allein über deren Fluoreszenzintensitätsunterschiede. Hierzu ist die individuelle Geräteeinstellung für die Fluoreszenzintensitätsermittlung primär nicht determinierend. Durch den täglichen Einsatz dieses Standards ist es möglich, technische Fehler des Durchflußzytometers bezüglich der Log-Amplifier schnell zu erkennen, und in der Langzeitauswertung der Messungen ist zudem die Überprüfung der individuellen Einstellung des Durchflußzytometers im Labor möglich. Durch die Ermittlung der MESF einer Messung (z. B. CD3-Expression der T-Lymphozyten) ist es auch theoretisch möglich, eine indirekte Aussage zur Antigen- bzw. Rezeptordichte zu entwickeln. In Kenntnis des Fluorochrom/Protein-Verhältnisses (F/P-Ratio) kann die Antigendichte pro Zelle ermittelt werden. Hierzu muß der MESF-«offset» der Eichkurve der fluoreszierenden Partikel ermittelt werden (z.B. MESF-«offset» 600 bei einer F/P-Ratio von 4 FITC-Molekülen pro IgG führt zu einem «calibrated log offset» von 250 Rezeptoren-äquivalenten). Mit anderen Worten, die untere Grenze der detektierbaren Rezeptordichte liegt bei 250 Rezeptoren-**KÄKGER**

© 1996 S. Kälger GmbH, Freiburg Fax: (0761)4520714

äquivalenten. Die FITC-Intensität der CD3-positiven T-Zellen-population ergibt z.B. einen Wert von $21800 \text{ MESF} \pm 0,3 \text{ Dekaden}$ ($9000-48800 \text{ MESF}$), so findet sich bei einer F/P-Ratio von 4 eine Rezeptordichte von 5450 ($2250-12200$). Hiervon muß die unspezifische Bindung (1000 MESF oder 250 Rezeptorenäquivalente) abgezogen werden, so daß der ermittelte MESF-Wert $20800 \pm 0,3 \text{ Dekade}$, bzw. die Rezeptordichte $5200 \pm 0,3 \text{ Dekade}$, beträgt. Diese Form der quantitativen Immunphänotypisierung setzt jedoch 3 Bedingungen voraus: (1) Die Fluoreszenzintensität pro Zelle muß direkt proportional zur Anzahl der gebundenen Liganden pro Zelle sein, (2) die Fluoreszenzintensität der Partikel-gebundenen Fluorochrome muß direkt proportional der Fluoreszenzintensität der auf der Zelle gebundenen Fluorochrome sein und (3) das Fluorochrom/Protein-Verhältnis muß exakt definiert und bekannt sein. Die hiermit verbundenen Probleme, unabhängig davon, daß nur direkt konjugierte Antikörper einsetzbar sind, sind evident [1].

Für die quantitative Immunphänotypisierung wurde daher mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung ein neuer Test-ansatz entwickelt («quantitative immuno-fluorescence indirect assay», Qifikit®, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg). Dieser Test standardisiert die Bindung monoklonaler Antikörper an der Zelloberfläche und transformiert bislang arbiträre Fluoreszenzeinheiten [«mean fluorescence intensity» (MFI)] in absolute Werte der gebundenen Antikörper pro Zelle, die der Anzahl der Antigene pro Zelle entsprechen [2, 3]. Das Prinzip dieses Testes beruht auf der Ermittlung der sättigenden Konzentration des Primärantikörpers durch Titration gegen das jeweilig zu analysierende Antigen mittels durchflußzytometrischer Analyse. Entsprechend dem Meßverfahren der fluoreszierenden Partikel wird nun mit definierten fluoreszierenden Partikeln eine Eichkurve für die Antigendichte entwickelt. Der Unterschied zu den Kalibrierungspartikeln besteht in der

Ermittlung absoluter Antigendichten gegenüber MESF-Werten. Hierzu sind Partikel notwendig, die über eine bekannte und reproduzierbare Antigendichte verfügen. Nach Inkubation des Sekundärantikörpers und Analyse der Fluoreszenzintensität kann dann über ein Rechenprogramm (z. B. TallyCAL®, DAKO) die Antigendichte der untersuchten Epitope ermittelt werden. Der Vorteil der quantitativen Immunphänotypisierung besteht in der Angabe eines standardisiert ermittelten Ergebnisses («Antigendichte pro Zelle») für Messungen, die bislang nur mit arbiträren Maßeinheiten qualifiziert werden konnten, sowie der großen Anzahl zugänglicher Epitope durch den indirekten Immunfluoreszenzansatz.

Literatur

Caldwell CW, Maggi J, Henry LB, Taylor HM: Fluorescence intensity as a quality control parameter in clinical flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 1987;88:447-456.

Lavabre-Bertrand T, George F, Brunet C, Sampol J: Quantitative immune phenotyping: A new dimension for the monitoring of haemopoietic malignancies. *Nouv Rev Fr Hematol* 1994;36:373-382.

Lavabre-Bertrand T, Janossy G, Exbravat C, Bourquard P, Duperray CH, Navarro M: Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. *Leukemia* 1994;9:1557-1563.

Vogt RF, Cross GD, Phillips DL, Henderson LO, Hannon WH: Interlaboratory study of cellular fluorescence intensity measurements with fluorescein-labeled microbead standards. *Cytometry* 1991;12:525-536.

Oonishi T, Uyesaka N: A new standard fluorescence microsphere for quantitative flow cytometry. *J Immunol* 1985;84:143-154.

Dux R, Kindler-Röhrborn A, Lennartz K, Rajewsky MF: Calibration of fluorescence intensities to quantify antibody binding surface determinants of cell sub-populations by flow cytometry. *Cytometry* 1991;12:422-428.

Infusions-therTransfusionsmed 1996;23:105-116
Höffkes/Schmidtke