

## Vijfkleurenflowcytometrie: met minder antistoffen meer celpopulaties bepalen

H.H.M. EIDHOF, J. DANNEBERG, W.G.H.J. 't GREFTE, F.M. VERHEIJEN en A. MARTENS

Immunofenotypering van cellen met behulp van flowcytometrie is een veelgebruikte methode om afwijkingen op te sporen in perifere bloed of beenmerg. De gebruikte fluorescerende monoklonale antistoffen zijn in internationale workshops ingeclusterd, zodat er bekend is met welke epitopen van de cel ze reageren. Hierdoor kan na analyse met behulp van de flowcytometer bekeken worden of de cellen een normaal reactiepatroon vertonen, of dat er bijvoorbeeld abnormale verhoudingen bij de subpopulaties van de lymfocyten aanwezig zijn (CD4/8-ratio). Met het beschikbaar komen van steeds meer soorten gelabelde antistoffen in diverse fluorescerende kleuren, wordt het interessant om te gaan kijken wat bijvoorbeeld vijfkleurenanalyse oplevert ten opzichte van het gebruik van driekleuren tegelijkertijd. Bij de lymfocytentyping die in deze studie gebruikt wordt, is de conclusie dat men meer informatie krijgt in minder tijd tegen lager verbruik van monoklonale antistoffen.

*Trefwoorden: lymfocytentyping; flowcytometrie; vijfkleurenanalyse; monoklonale antistoffen*

Op het klinisch laboratorium van de Ziekenhuis Groep Twente te Almelo wordt dagelijks met behulp van flowcytometrie onderzoek gedaan naar CD4/8-ratio's en lymfocytentypingen in verband met onderzoek naar afwijkende immunestatus of bij onbegrepen lymfocytose (1). Wij streven hierbij naar het verkrijgen van de juiste informatie op een snelle, eenvoudige en kosteneffectieve wijze. Voor deze bepalingen werd eerder gebruik gemaakt van een panel met Fitc-, PE- of PerCp-direkt-gelabelde monoklonale antistoffen (MoAb). Hierbij vond driekleurenfluorescentie-flowcytometrie plaats van die lymfocytenpopulaties, die ook in de landelijke SKML-kwaliteitscontroleprogramma's werden bepaald (2), door onszelf aangevuld met HLADr om geactiveerde T-lymfocyten te kunnen aantonen. Met een nieuwe vijfkleurenflowcytometer waarbij gebruik gemaakt wordt van Fitc-, PE-, ECD-, PerCp- en PC7-gelabelde MoAb's, is het nu mogelijk om meer informatie tegelijkertijd te verkrijgen. Wij hebben onderzoek verricht naar de meerwaarde van deze vijfkleurenanalyse. Om dit uit te zoeken hebben wij een panel bestaande uit twee analysebuisjes met daarin gelabelde antistoffen in vijf

verschillende kleuren vergeleken met de gebruikelijke driekleurenanalyse met vijf buisjes.

### Materialen en methoden

Voor de labeling van de lymfocyten met fluorescerende MoAb's is gebruik gemaakt van: CD45 PerCp, CD3PE, CD3 Fitc, CD4 PE, CD5 Fitc, CD8 PE, CD16 PE, CD19 PE, HLADr PE, allen van Beckton Dickinson (BD, Woerden, Nederland), en CD19 ECD, HLADr ECD, CD3 PC7 van Beckman Coulter (BC, Mijdrecht, Nederland). De volgende flowcytometers zijn gebruikt: FACSort van BD en de FC500 Cytomics van BC. Als monstermateriaal voor de bepaling wordt met K<sub>3</sub>EDTA ontstold volbloed gebruikt, dat binnen 24 uur na afname werd geanalyseerd.

De gebruikelijke driekleuren-lymfocytenlabeling werd vergeleken met een vijfkleuren-lymfocytenlabeling (zie tabel 1 en 2 voor de combinaties). Subpopulaties van lymfocyten worden vaak op de volgende wijze onderscheiden: T-Lymfocyten (CD3-positief); B-Lymfocyten (CD19-pos); T-helper/inducercellen (CD3- én CD4-positief); T-suppressor/cytotoxische cellen (CD3- én CD8-positief); NK-cellen (CD3-negatieve, CD16/56-positieve lymfocyten); CD5-positieve T-lymfocyten en CD5-positieve B-Lymfocyten. HLADr is naast activatiemarker ook bruikbaar als extra B-lymfocytenmarker. Zowel bij de drie- als bij de vijfkleurencombinaties werd alleen gebruik gemaakt van direct gelabelde monoklonale antistoffen. De concentratie van de gebruikte antistoffen is reeds eerder door titratie-experimenten geoptimaliseerd. Bij de vijfkleurenlabeling op de FC500 wordt gebruik gemaakt van een door ons

**Tabel 1.** Monoklonale antistoffen ingezet bij driekleuren-immunofenotypering

| Label | Buis 1 | Buis 2 | Buis 3 | Buis 4    | Buis 5 |
|-------|--------|--------|--------|-----------|--------|
| Fitc  | CD 3   | CD 3   | CD 3   | CD 3      | CD 5   |
| PE    | HLA Dr | CD 4   | CD 8   | CD 16+ 56 | CD 19  |
| PerCp | CD 45  | CD 45  | CD 45  | CD 45     | CD 45  |

**Tabel 2.** Monoklonale antistoffen ingezet bij vijfkleuren-immunofenotypering

| Label | Buis 1 | Buis 2     |
|-------|--------|------------|
| Fitc  | CD 4   | CD 5       |
| PE    | CD 8   | CD 16 + 56 |
| ECD   | HLA Dr | CD 19      |
| PerCp | CD 45  | CD 45      |
| PC7   | CD 3   | CD 3       |

Ziekenhuis Groep Twente, locatie Twenteborg, Almelo

Correspondentie: A. Martens, laboratoriumarts, Klinisch laboratorium, Ziekenhuis Groep Twente, locatie Twenteborg, Zilvermeeuw 1, 7609 PP Almelo. E-mail: amartens@ZGT.nl

zelf samengestelde premix van de 5 betreffende MoAb's. Bij de driekleuren-analyse wordt gebruik gemaakt van dual en single MoAb's (meestal 5 µl per buisje), zoals door de leverancier is aangeleverd.

Zoals blijkt uit tabel 1 en 2, worden er voor het bepalen van de lymfocytensubpopulaties, bij de driekleurenflowcytometrie 5 buisjes ingezet. Dit aantal is noodzakelijk omdat in elk buisje CD45-MoAb wordt toegevoegd om zo een robuuste lymfocyten-'gating' te garanderen (CD45 versus zijwaartse lichtverstrooiing, SSC) (2). Deze methode wordt in de internationale literatuur (3), en ook in de landelijke SKMI/SKML-protocollen geadviseerd. Bij de vijfkleurenanalyse worden twee buisjes ingezet. Bij beide methoden wordt er per buisje 50 µl bloed gepipetteerd. Na samenvoegen van bloed en MoAb's wordt er gemengd en worden de buisjes 12 minuten bij kamertemperatuur in het donker bewaard. Hierna wordt er bij de driekleurenanalyse 10 minuten gelyseerd met 1 ml FACS-lysing (BD), 5 minuten gecentrifugeerd bij 400 g en wordt de celpellet geresuspendeerd in 1 ml PBS/BSA 0,2%. Bij de vijfkleurenanalyse wordt er met 1 ml verse, eigen bereide ammoniumchloride-'lysing' gelyseerd. Na mengen en 10-30 minuten incubatie bij kamertemperatuur in het donker, worden de cellen direct gemeten op de FC500 met behulp van de aanwezige autosampler. Dit is de zogenaamde 'Lyse-No-Wash'-methode.

## Resultaten

Met de mogelijkheid van vijfkleurenfluorescentie bij immunofenotypering van lymfocyten in perifere bloed, blijven er naast de verplichte aanwezigheid van CD45 voor een goede 'gating' van de lymfocyten en CD3 voor analyse van T-lymfocyten en LGL-cellen, nog drie mogelijkheden over voor het bepalen van andere lymfocytensubpopulaties. Hierdoor is het dus mogelijk om met minder buisjes meer te analyseren (zie tabel 3 en 4). Bovendien worden de CD4-positieve lymfocyten en de CD8-positieve lymfocyten in hetzelfde buisje gemeten, zodat eventueel CD4- en CD8-'dubbelpositieve' T-lymfocyten ook gezien worden. Dit is bij een aantal rijpe T-celmaligniteiten van belang (4).

**Tabel 4.** Vergelijk celpopulaties drie- en vijfkleurenanalyse

| Nr | Celpopulatie                     | Selectie op          | driekleuren-analyse | vijfkleuren-analyse |
|----|----------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| 1  | Lymfocyten                       | CD45+, SSC           | +                   | +                   |
| 2  | T-Lymfocyten                     | Lymfo, CD3+          | +                   | +                   |
| 3  | T-helper/inducer                 | T-Lymfo, CD4+        | +                   | +                   |
| 4  | T-suppressor/cytotoxisch         | T-Lymfo, CD8+        | +                   | +                   |
| 5  | NK-cellen                        | Lymfo, CD3-,16/56+   | +                   | +                   |
| 6  | LGL-cellen                       | Lymfo, CD3+,16/56+   | +                   | +                   |
| 7  | CD5-pos T-lymfocyten             | Lymfo, CD19-,CD5+    | +                   | +                   |
| 8a | B-Lymfocyten                     | Lymfo, CD19+         | +                   | +                   |
| 8b | B-Lymfocyten                     | Lymfo, CD3-,HLADr+   | +                   | +                   |
| 9  | CD5-pos B-Lymfocyten             | Lymfo, CD19+,CD5+    | +                   | +                   |
| 10 | Geactiveerde T-Lymfocyten        | T-Lymfo, HLADr+      | +                   | +                   |
| 11 | CD4+,8+-dubbelpos lymfocyten     | T-Lymfo, CD4+,CD8+   | -                   | +                   |
| 12 | Geactiveerde T-helper/inducer    | T-Lymfo, CD4+,HLADr+ | -                   | +                   |
| 13 | Geactiveerde T-suppr/cytotoxisch | T-Lymfo, CD8+,HLADr+ | -                   | +                   |
| 14 | CD3+,CD5-lymfocyten              | T-Lymfo, CD5-        | -                   | +                   |
| 15 | LGL-subpopulaties (4)            | LGL-cellen           | -                   | +                   |

**Tabel 3.** 'Less is more'

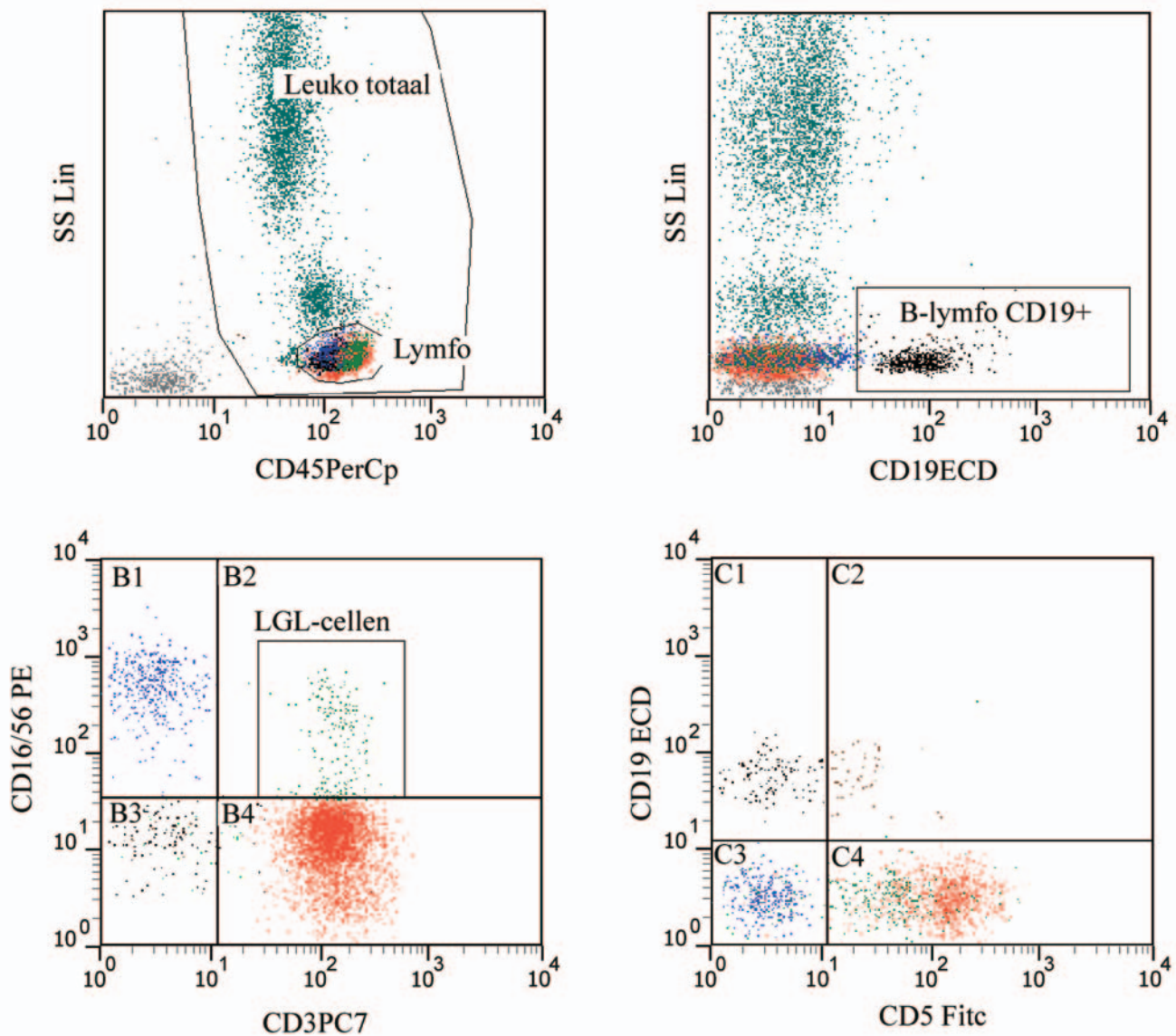
|                           | 3 kleuren | 5 kleuren |
|---------------------------|-----------|-----------|
|                           | 'More':   | 'Less':   |
| # buisjes nodig           | 5         | 2         |
| µl bloed nodig            | 250       | 100       |
| µl monoclonalen           | 75 (€ 20) | 50 (€ 15) |
| Totale analysetijd        | 50        | 30        |
| Analistentijd             | 25        | 15        |
|                           | 'Less':   | 'More':   |
| # lymfocytensubpopulaties | 10        | 14+       |

Ook is het nu mogelijk om bij beschikking over goede analysesoftware, via 'gating' op subpopulaties, nog weer verdere onderverdelingen te maken, die mogelijk interessant zijn bij immunologische afwijkingen, maligniteiten of infecties (zie figuur 2). Voor de algehele interpretatie zijn de gekleurde plotjes heel geschikt.

## Discussie

Met de introductie van de vijfkleurenanalyse, zijn er ruimere mogelijkheden ontstaan om met weinig onderzoeksmateriaal en met minder benodigde antistoffen, in kortere tijd meer informatie te verkrijgen. Een aantal zaken zijn hierbij echter wel van belang:

- de gebruikte apparatuur moet stabiel zijn (vloeistof-systeem én elektronica)
- de compensatie-instellingen moeten goed afgeregeld worden en in het hoge en lage gebied lineair zijn
- de gebruikte monoklonale antistoffen moeten getest zijn op titer en stabiliteit. Men name de tandem-conjugaten kunnen namelijk uiteenvallen bij verkeerd gebruik, hierbij kan bijvoorbeeld een PE-CY5-gelabelde antistof CY5 verliezen: het signaal wordt dan ten onrechte in het PE-kanaal gedetecteerd waardoor foute interpretaties ontstaan
- instellingen en werking van apparatuur moeten op relatief eenvoudige wijze te controleren zijn (bijvoorbeeld met behulp van 'beads')
- de te gebruiken analyseprogramma's moeten de interpretatie eenvoudig maken.



**Figuur 1.** Normaal perifeer bloed.

Natuurlijk zijn bovengenoemde zaken ook voor driekleurenflowcytometrie van belang. De complexiteit van interpretatie, de instellingen en compensatieprocedures nemen echter toe bij vijfkleurenflowcytometrie. Betrouwbaarheid van het systeem is juist in deze situatie van groot belang; afwijkingen veroorzaakt door technische problemen zijn vaak niet in een oogopslag zichtbaar. Indien men echter de driekleurenanalyse goed beheerst, is de overstap naar vijfkleurenanalyse geen groot probleem en in onze ervaring goed te doen. De vijfkleurenanalyses werden in onze situatie uitgevoerd op een FC500-flowcytometer. Bij validatie bleek dit apparaat aan de hiervoor opgegeven criteria te voldoen. In de figuren 1 tot en met 4 zijn er voorbeelden weergegeven van de mogelijkheden met deze meerkleurenanalyse. Belangrijk is steeds om de geanalyseerde data op een inzichtelijke manier middels deze plotjes weer te geven. Zo wordt er door ons altijd een plotje gemaakt waarin een antistofreactie uitgezet wordt tegen de 'side scatter' van de onderzochte cellen. Dit levert bijvoorbeeld bij de analyse van de 'hairy cellen' (figuur 3) de aanwijzing op dat er B-cellen aanwezig zijn met een verhoogde

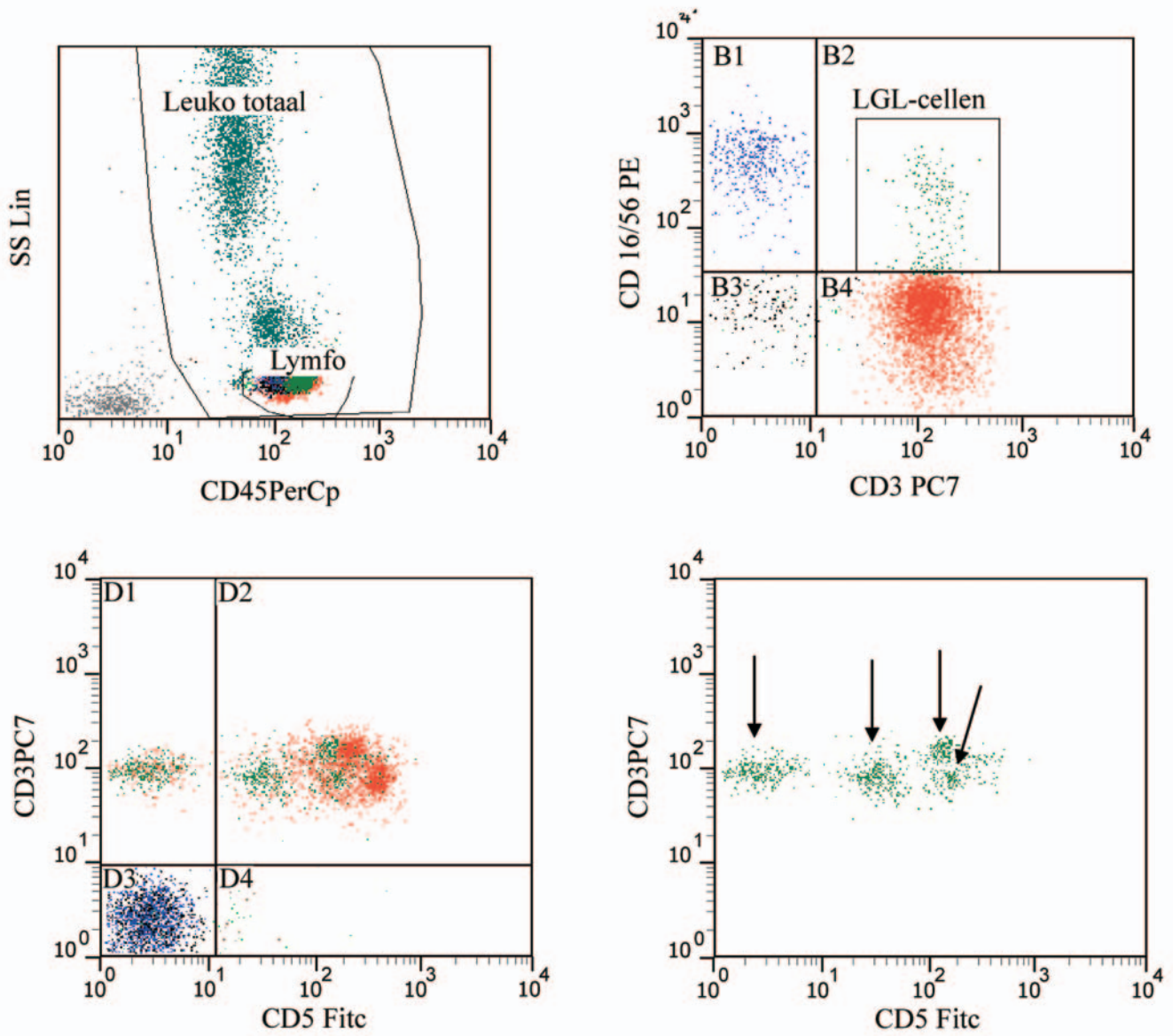
'side scatter', wat karakteristiek is voor villeuze B-cellen (vergelijk met figuur 1). Tevens biedt deze methode meer mogelijkheden om nieuwe toepassingen met verdere subanalyse te gaan uitvoeren. In figuur 2 zijn bijvoorbeeld een aantal LGL-subsets te zien, waarvan momenteel de betekenis nog niet geheel duidelijk is.

Voor leukemie- en lymfoomdiagnostiek en voor minimale restziekte, is de vijfkleurenanalyse ook van grote waarde omdat hierbij meer specifiek afwijkende en relatief kleine aantallen cellen gedetecteerd kunnen worden.

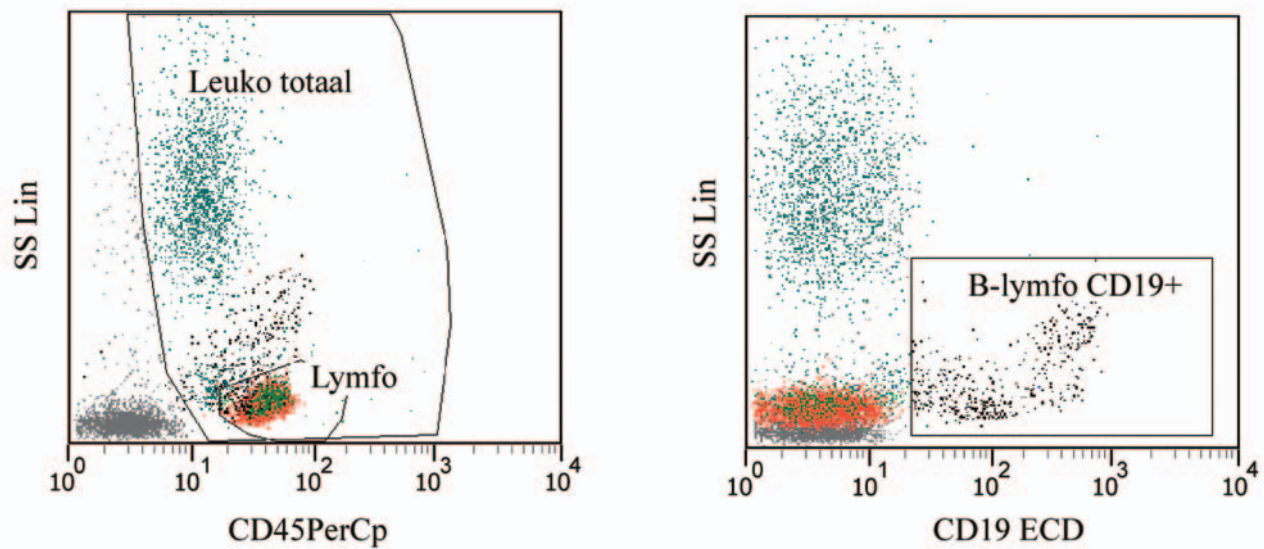
### Conclusie

In vergelijking met de gebruikelijke driekleurenanalyse, biedt vijfkleurenanalyse een aantal voordelen:

- minder monoklonalenverbruik
- minder patiëntenmateriaal nodig
- meer subpopulaties aantoonbaar
- meer mogelijkheden voor leukemie-/lymfoomdiagnostiek en onderzoek naar minimale restziekte
- sneller
- goedkoper



**Figuur 2.** Viraal infectie met LGL-subpopulaties.



**Figuur 3.** 'Hairy cell'-leukemie; B-cellen met verhoogde SSC.

Verder zijn de eisen die gesteld worden aan de apparatuur wat hoger en vereist de interpretatie van de resultaten bij de analisten wat meer inzicht.

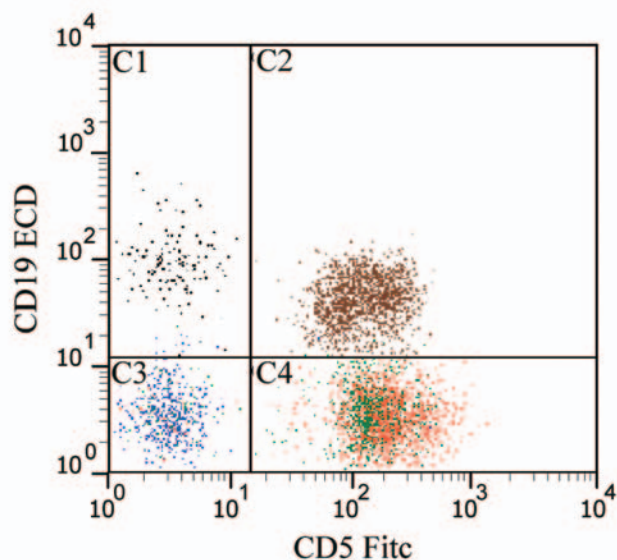
#### Literatuur

1. Eidhof HHM, Eertman HG, Endenburg SC, Verhaegh JJ, Martens A. Screening op B-celmaligniteiten bij patiënten ouder dan 40 jaar. *Ned Tijdschr Geneesk* 1999; 143: 2598.
2. Gratama JW, Beers WAM van, Eidhof H, Hooijkaas H, Kester R, Kraan J, Levering WHBM, Sintnicolaas K, Wind HK, Preijers F. Externe kwaliteitsbewaking van flowcytometrische immunofenotypering. In: *Nieuwe diagnostische toepassingen van flowcytometrie*, ISBN: 90-73436-63-X. 2003; 223-235.
3. Gratama JW, et al. Reduction of variation in T-cell subset enumeration among 55 laboratories using single-platform, three or four-color flow cytometry based on CD45 and SSC-based gating of lymphocytes. *Cytometry* 2002; 50: 92-101.
4. Wering ER van, Lochem EG van, Sluijs-Gelling AJ van der, Preijers F, Gratama, JW, Kraan J, Schoot CE van de, Dongen JJM van. Antistofpanels voor drievoudige kleuringen ten behoeve van flowcytometrische immunodiagnostiek van rijpe en onrijpe hematologische maligniteiten. In: *Nieuwe diagnostische toepassingen van flowcytometrie*, ISBN: 90-73436-63-X. 2003; 49-67.

#### Summary

*Flowcytometrics: detection of more cellpopulations with less antibodies. Eidhof HHM, Danneberg J, Grefte WGHJ 't, Verheijen FM and Martens A. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2004; 29: 317-321*

Immunofenotyping of cells by flowcytometry is a widely used method for screening on abnormalities in blood or bone marrow. The fluorescent monoclonal antibodies used here, were assigned in international workshops and CD specificities



**Figuur 4.** Lymfocyt gate bij B-CLL.

are known. Therefore we can see if the cells have a normal staining pattern or whether there are abnormal subpopulations of lymphocytes present in the tested material (CD 4/8 ratio). Today a continuous increasing number of diversely labelled antibodies for immunofenotyping cells by flowcytometry is available. That's why it is interesting to see, what are the advantages of typing with five colour flowcytometry versus three colour. When typing lymphocytes, like we did in this study, our conclusion is that we get more information in less time with use of less antibody.

*Key words: Lymphocyte typing; flowcytometry; five colour; monoclonal antibodies*