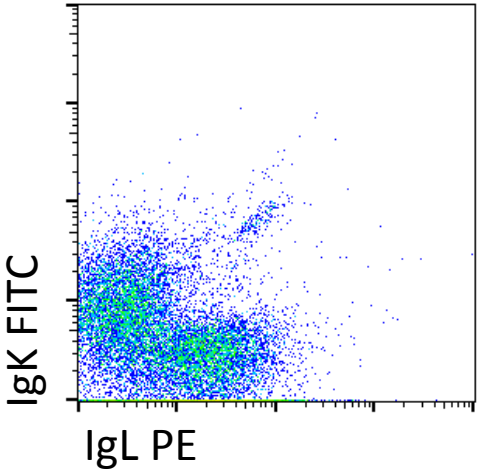
Design, titrace a validace cytometrického testu

Michaela Nováková a Markéta Musilová

Kombinace pro detekci klonálních B lymfocytů

- Proliferace z B lymfocytů: chronická lymfatická leukémie (CLL), Burkittův lymfom, lymfom z plášťových buněk...
- Buňky typicky exprimují pouze jeden z lehkých řetězců **kappa (IgK)/lambda (IgL)** (normální poměr 1:1-3:1)
- Typický fenotyp CLL je **$CD5^{pos}CD20^{dim}$**
- Původní panel: IgK/IgL/CD19/CD10/CD20/CD45/CD5/CD38



Nedostatečné rozlišení kappa+/lambda+ buněk

=> Vývoj nové kombinace (kombinace sušených reagencií + drop-in reagencie dle volby)

Krok 1: Návrh nové kombinace *(B-CLL)*

- Složení (varianta 1):
- Lambda FITC / Kappa PE / CD45 PerCP-Cy5.5 / CD19 PE-Cy7 / CD5 APC / CD20 Pacific blue

- Drop-in:
- CD38 Alexa Fluor 700 / CD10 BV605

Krok 2: titrace reagencií

FITC	PE	PerCP-Cy5-5	PE-Cy7	APC	Pacific Blue
Lambda	Kappa	CD45	CD19	CD5	CD20
ED7216-1	ED7222-1	ED7095-1	ED7133-1	ED7242-1	ED7181-1

Ředící řada:
CD5 APC (konc. 20 µg/ml):
10 µg/ml; 5 µg/ml; 2,5 µg/ml; 1,25 µg/ml; 0,625 µg/ml

Ředící řada:
CD19 PE-Cy7 (30 µg/ml), CD20 PB (100 µg/ml),
CD45 PerCP-Cy5.5 (80 µg/ml),
Kappa PE (80 µg/ml), Lambda FITC (80 µg/ml):
20 µg/ml; 10 µg/ml; 5 µg/ml; 2,5 µg/ml; 1,25 µg/ml

Study Log Sheet / Záznamy o studii

Study Approval / Schválení studie:		
Lead Investigator Name / Jméno Vedoucího studie:	Signature / Podpis :	Date / Datum:
Doc. MUDr. Tomáš Kalina, PhD.		11.4.2018

Study Performance / Provedení studie:	
Date of Study / Datum studie:	6. dubna 2018
Performed by / Provedena kým:	Mgr. Markéta Mecerodová

Flow Cytometer / Průtokový cytometr	
Instrument Manufacturer / Výrobce:	Becton Dickinson, BD
Instrument Model / Model:	BD FACSLyric
Software Version / Verze Software:	BD FACSuite, v1.2.0.5662

Tested Product / Testovaný produkt	Cat. No. / Katalogové č.	Lot Number / Č. šarže	Expiration Date / Exspirace
CD5 APC, 20 µg/ml	ED7242-1	600975	05/2019

Control Reagents (Manufacturer) / Kontrolní reagencie (Výrobce)	Cat. No. / Katalogové č.	Lot Number / Č. šarže	Expiration Date / Exspirace

Krok 2: titrace reagencií

Verification Protocol / Návrh verifikace

Specimen # 1 / Testovací vzorek č. 1	
Diagnosis / Diagnóza:	C910 (akutní lymfoblastická leukemie), M, 10 let, po skončení léčby
Type of Specimen / Typ vzorku:	nesrážlivá periferní krev (K_3EDTA)
Specimen Age / Stáří vzorku:	1 den
Sample Preparation Method / Metoda přípravy vzorku:	protilátky (15 min), lýzo (15 min), slít, resusp. ve 200 µl PBS
Lysing solution used / Použité lyzační činidlo	NH4Cl

Pipetovací protokol

Číslo zkumavky	**A** 10 µg/ml	**B** 5 µg/ml	**C** 2,5 µg/ml	**D** 1,25 µg/ml	**E** 0,625 µg/ml
Objem krevního vzorku (µl)	35	35	35	35	35
Objem TESTOVANÉHO Produktu (µl)	35	35	35	35	35
Objem REFERENČNÍ reagencie (µl)	0	0	0	0	0
Objem kontrolních reagencií:					

Krok 2: titrace reagencií

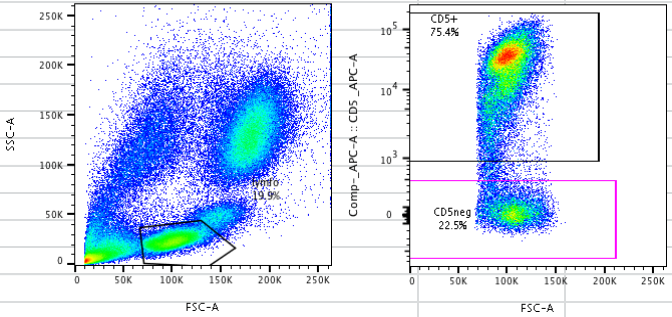
Data Analysis and Results / Analýza dat a výsledky

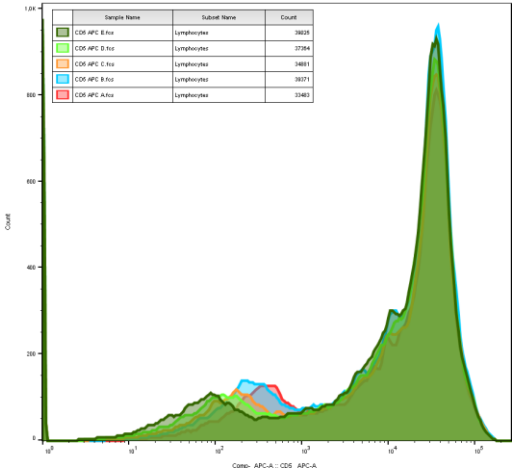
Specimen # 1 / Testovací vzorek č. 1		
Data Analysis Software / Software pro analýzu dat	FlowJo 10.4.2	
Analysed Parameters / Analyzované Parametry	Target cell population Median Fluorescence / Medián Fluorescence cílové	Ly+, CD5+
	Negative cell population Median Fluorescence / Medián Fluorescence	Ly+, CD5neg
	% of Target cell population / % buněk cílové populace	Ly+, CD5+

Results / Výsledky

Číslo zkumavky	Testovaný produkt (µg/ml)	Referenční reagent (µl)	MFI cílové buňky	MFI negativní buňky	% cílových buněk
A	10.00	0	27826	156	76.6
B	5.00	0	27758	91.8	76
C	2.50	0	27826	67.9	75.7
D	1.25	0	27091	48.1	75.4
E	0.625	0	26634	37.9	76

Gating Procedure / Postup analýzy dat





Conclusion / Závěr

Optimální titr CD5 APC: 1,25 µg/ml

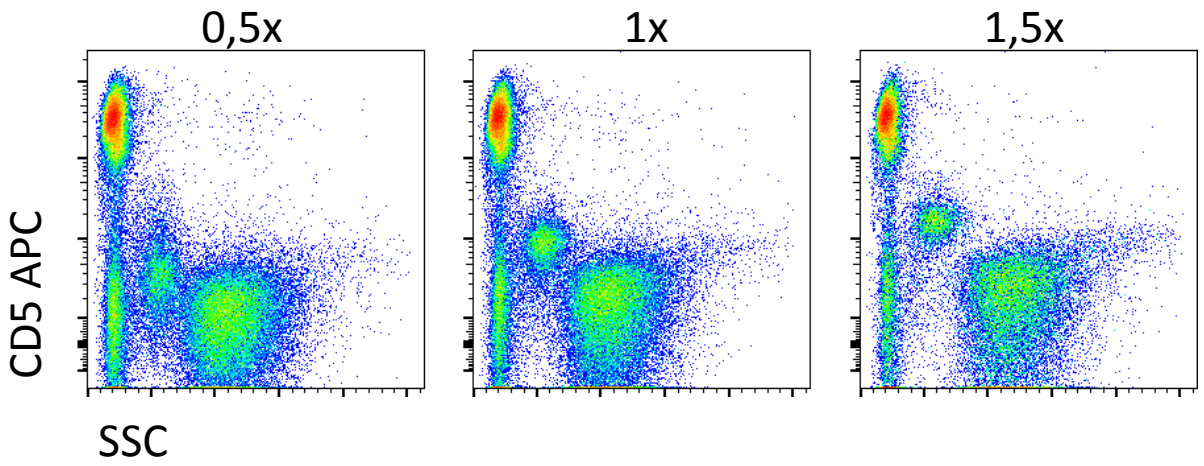
Krok 2: titrace reagencií

Výsledné koncentrace:

CD5 APC	1,0 µg/ml
CD45 PerCP-Cy5.5	1,1 µg/ml
CD20 PB	4,0 µg/ml
CD19 PE-Cy7	1,3 µg/ml
Kappa PE	5,0 µg/ml
Lambda FITC	5,0 µg/ml

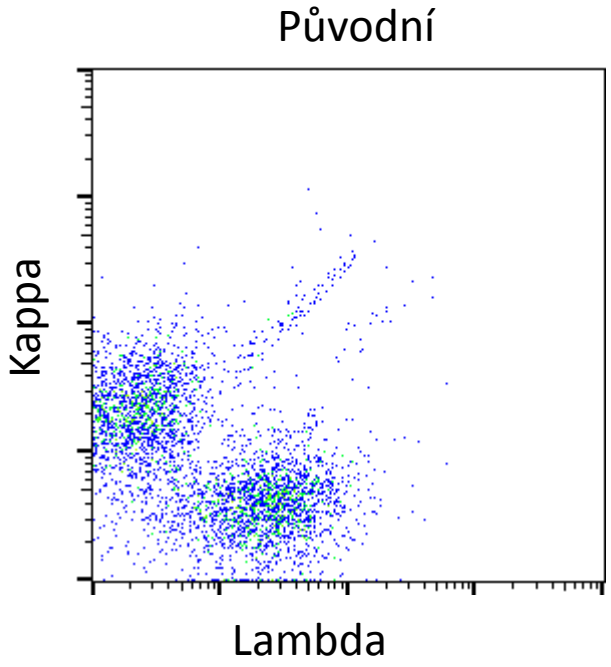
Příprava celého mixu a test robustnosti:

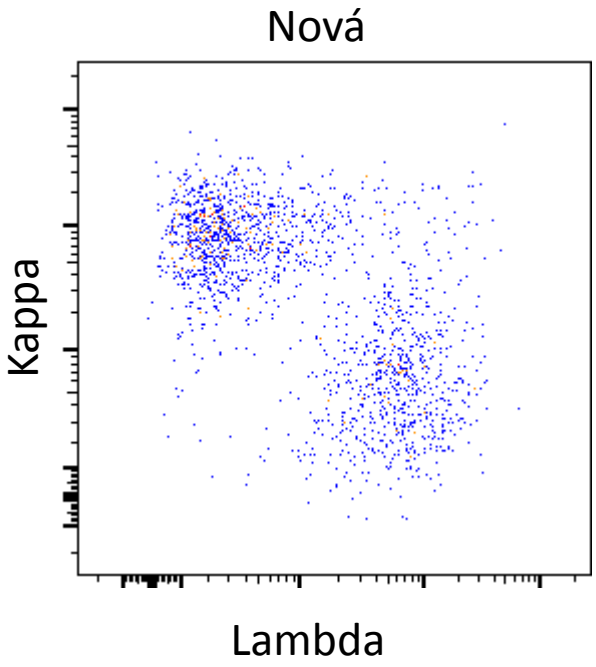
- test mixu ve finální koncentraci
- 1,5x větší koncentrace
- 0,5x koncentrace



Krok 3: validace

Změřeno 11 pacientů a porovnána data (původní vs nová kombinace)





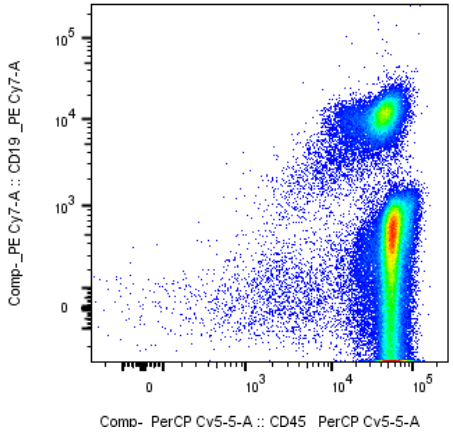
Krok 4: Jsme zpátky na začátku?

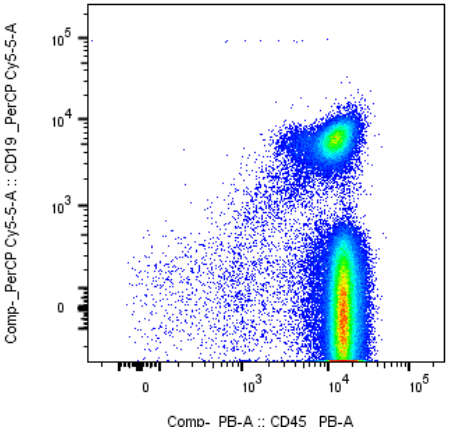
- Zkušenosti z jiných laboratoří: přesvit z CD45 PerCP-Cy5.5 do CD19 PE-Cy7
  - Rozlišení $CD19^{pos}$ a $CD19^{neg}$ může být (při špatně udělané kompenzaci) složité!

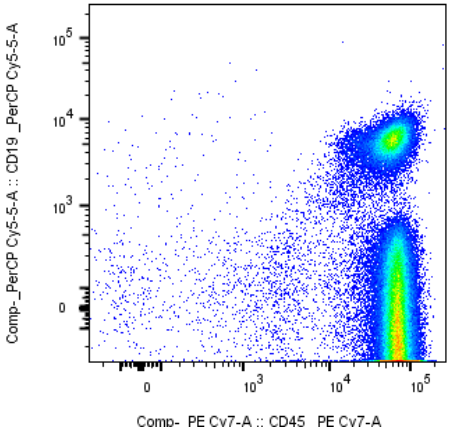
- Původní varianta:
- Lambda FITC / Kappa PE / CD45 PerCP-Cy5.5 / CD19 PE-Cy7 / CD5 APC / CD20 Pacific blue

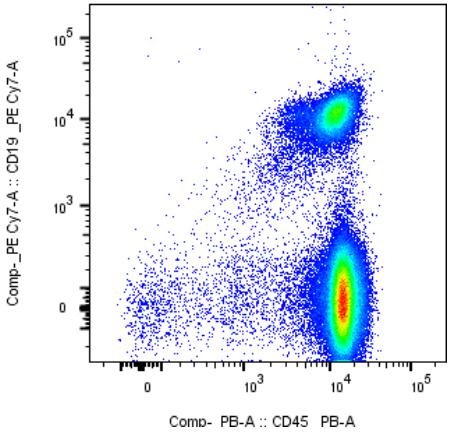
- Alternativa 1:
- Lambda FITC / Kappa PE / CD19 PerCP-Cy5.5 / CD20 PE-Cy7 / CD5 APC / CD45 Pacific blue
- Alternativa 2:
- Lambda FITC / Kappa PE / CD19 PerCP-Cy5.5 / CD45 PE-Cy7 / CD5 APC / CD20 Pacific blue
- Alternativa 3:
- Lambda FITC / Kappa PE / CD20 PerCP-Cy5.5 / CD19 PE-Cy7 / CD5 APC / CD45 Pacific blue

Krok 4: nové alternativy









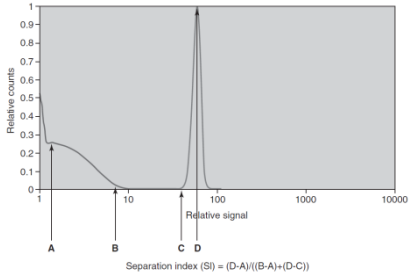
SI:	15	14.5	12.9	41.2
SpI	1.73	1.78	1.78	1.78

Staining index:

$$\frac{Mean^{pos} - Mean^{neg}}{2 * SD^{neg}}$$

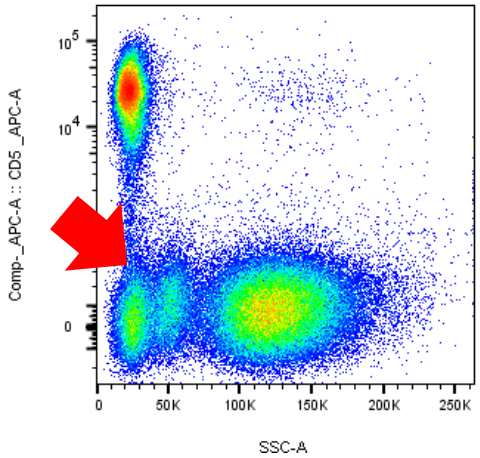
Separation index:

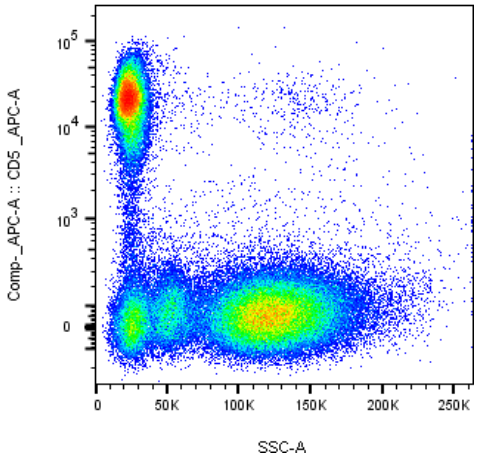
$$\frac{Median^{pos} - Median^{neg}}{(95^{th}\ Percentil^{neg} - Median^{neg}) + (Median^{pos} - 5^{th}\ Percentil^{pos})}$$



Krok 5: titrace nové kombinace

- Titrace nového koktejlu – 50 µl vzorku + 40 µl/20 µl/10 µl/5 µl koktejlu





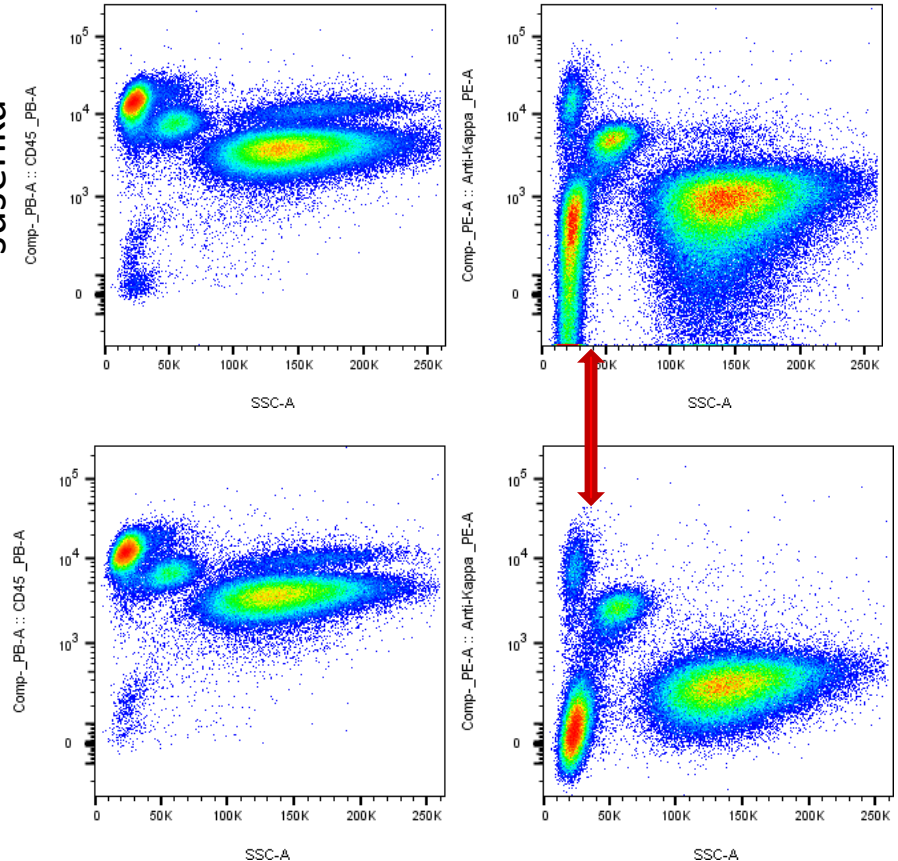
CD5 APC	1,0 µg/ml	snížení na 0,5 µg/ml
CD45 PB	1,1 µg/ml	zůstává
CD20 PerCP-Cy5.5	4,0 µg/ml	snížení na 2 µg/ml
CD19 PE-Cy7	1,3 µg/ml	zůstává
Kappa PE	5,0 µg/ml	snížení na 2,5 µg/ml
Lambda FITC	5,0 µg/ml	snížení na 2,5 µg/ml

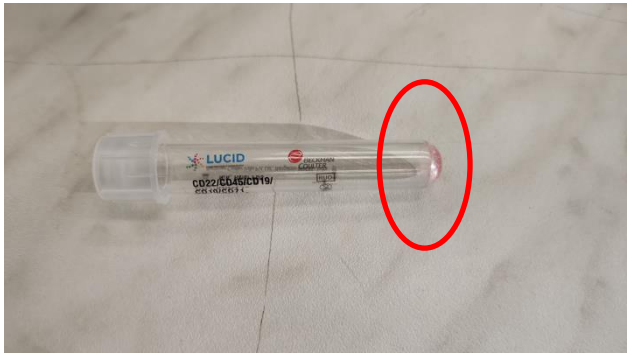
Krok 6: srovnání „mixu“ a „sušenky“

- Lambda FITC / Kappa PE / CD20 PerCP-Cy5.5 / CD19 PE-Cy7 / CD5 APC / CD45 Pacific blue

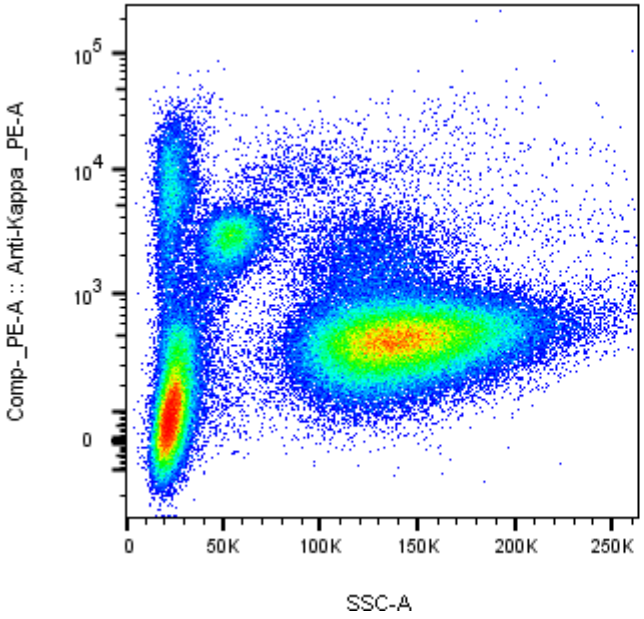
sušenka

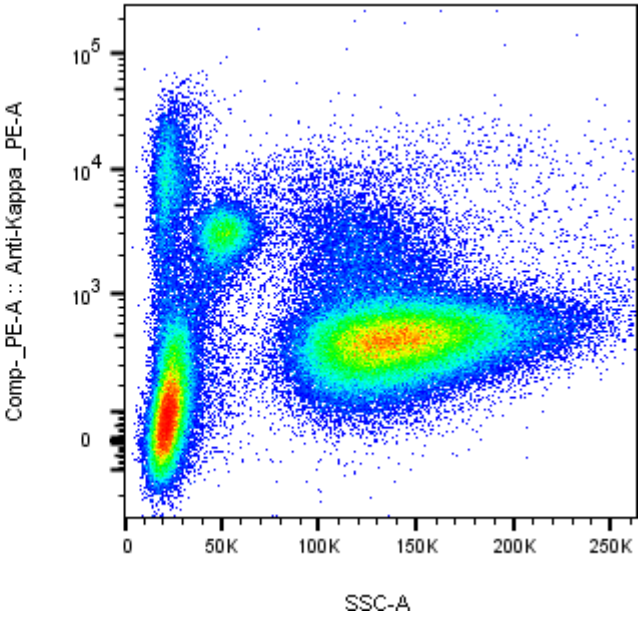
mix





Krok 6: srovnání „mixu“ a „sušenky“ (2.kolo)





Krok 7: objednávka a test „sušenek“

Custom Product Ordering Form:

EXBIO Product Cat. No.*:	**CP0001**

Date:	08/10/2018
Customer name:	Tomas Kalina
Customer number:	01851
Customer address:	Klinika dětské hematologie a onkologie, Fakultní nemocnice v Motole, V Úvalu 84/123, Praha 5 - Motol, Česká republika
Contact e-mail:	tomas.kalina@lfmotol.cuni.cz

Product name:	B-CLL
Number of ordered tests:	**250**

Product specification:

Reagent:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
EXBIO Cat. Number:	ED7095	ED7242	ED7133	ED7181	ED7222	ED7216						
Antigen:	CD45	CD5	CD19	CD20	Ig Kappa	Ig Lambda						
Fluorochrome:	Pacific Blue	APC	PE-Cy™7	PerCP-Cy™5.5	PE	FITC						
Volume per 1 Test (ul):	1.1	0.5	1.3	2.0	2.5	2.5						

SAMPLE:
Volume (ul): 50
Material:
- ❒ Peripheral blood EDTA
- ❒ ~~Peripheral blood Heparin~~
- ❒ ~~Bone marrow~~

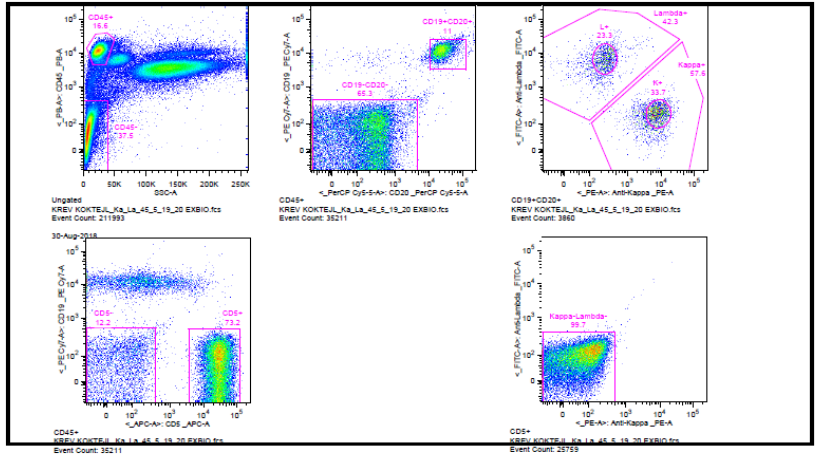
Other:

INCUBATION:
Time (min.): 15
Temperature (°C): 23

LYSIS:
Lysing solution: Ammonium chloride NH_4Cl
Volume (ul): 3000
- ❒ Wash
- ❒ ~~No wash~~

Comments / Notes:
wash with 3 ml of 0,5% BSA with PBS two times before adding antibodies

FC Data:**



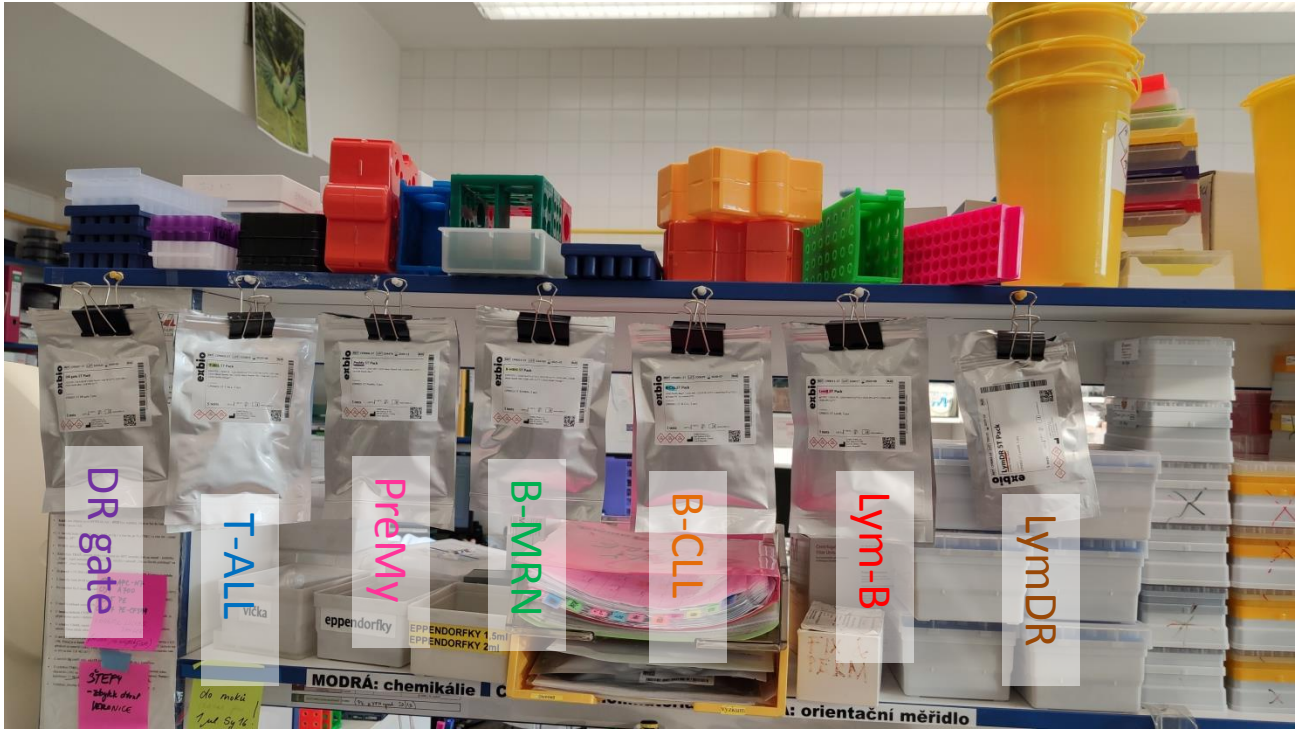
* Do not fill - will be filled by EXBIO

** Please attach model pattern in jpg. format or FCS file, if neccessary including gating strategy and other details.

Závěry

- Příprava cytometrického panelu je komplexní proces sestávající z výběru protilátek, titrace, studia vzájemného ovlivňování přesvitem a ověřování fungování v mixu/usušeném stavu, příp. opakováním těchto kroků v blíže neurčeném počtu...
- v případě B-CLL zkumavky trval celý proces 7 měsíců (9 měsíců do plného použití v rutině)
- Konečný formát sušených reagencií je stabilní, umožňuje vzájemnou porovnatelnost mezi pacienty i v čase
- Významné zlepšení kvality!! Aneb 7 měsíční práce za to stojí ☺

Poděkování



Tomáš Kalina
Martina Vášková
Veronika Kanderová

Ondřej Hrušák
Ester Mejstříková

Markéta Musilová
Pavla Luknárová
Katka Rejlová
Daniel Thürner
Pavel Semerák
a další

Jolana Vosáhlová
Miro Benko
Aleš Efenberk
a další