



Abgleich von Zellzählungsergebnissen zwischen Vi-CELL XR und Vi-CELL BLU

Bei Einführung einer neuen Gerätetechnologie kann es notwendig sein, Protokolle auf den neuen Plattformen erneut zu validieren. Dies kann jedoch kostspielig und zeitaufwändig sein.

Deshalb haben wir den Vi-CELL BLU mit der Möglichkeit ausgestattet, die Zelltyp-Einstellungen flexibel so anzupassen, dass die Ergebnisse denjenigen entsprechen, die bei der Analyse einer gleichwertigen Probe auf dem Vi-CELL XR ermittelt wurden. Ein vollständiger Abgleich ist vermutlich nicht in allen Fällen möglich, da sich die Leistungscharakteristika der beiden Geräte stark unterscheiden, doch bei vielen Zelltypen sollte es gelingen, die Leistung der beiden Geräte in ausreichendem Maß abzugleichen.

Zum Nachweis wurde eine Reihe verschiedener Zelltypen auf dem Vi-CELL XR mit typischen Parametern für den jeweiligen Zelltyp analysiert.

Gleichzeitig (um zeitbedingte Abweichungen zu reduzieren) wurden Duplikate der Proben auf Vi-CELL BLU Geräten mit den Standardparametern für den jeweiligen Zelltyp analysiert. Die Daten des Vi-CELL BLU wurden anschließend erneut analysiert, wobei die Zelltypparameter angepasst wurden, bis ein neuer Zelltyp generiert wurde, dessen Konzentration im Bereich von $\pm 5\%$ * lag und dessen Dichte lebensfähiger Zellen im Bereich von $\pm 2,5\%$ * um den entsprechenden mit dem Vi-CELL XR ermittelten Wert lag. Danach wurden Replikate unter Verwendung des neuen Zelltyps analysiert, um die Leistung zu bestätigen.

Methoden

1. Die Vi-CELL XR und Vi-CELL BLU Geräte zunächst mit den vom Hersteller empfohlenen Standard-Beads und -Protokollen kalibrieren.
2. Dann die Geräteleistung mit 1 Mio. Beads/ml BEC-Konzentrationskontrollen (Bestellnr. 175478) auf den Vi-CELL XR und Vi-CELL BLU Geräten verifizieren. (Es können auch andere Bead-Konzentrationen verwendet werden, solange die Konzentration mit einem anderen Partikelzähler, z. B. dem Multisizer Coulter Counter, bestimmt wird.)
3. Vor den weiteren Schritten dürfen die Konzentrationsmessungen der Geräte maximal um 5 % voneinander abweichen.
4. Zellen auf dem Vi-CELL XR nach Auswahl der gewünschten Zelltypen analysieren. Die Zellwerte müssen > 2 Mio./ml und $> 50\%$ Vitalität (vorzugsweise $> 70\%$) erreichen. Die Daten zur späteren Auswertung exportieren. Es wird empfohlen, Replikate zu analysieren, um die statistische Sicherheit zu erhöhen.
5. Proben derselben Zellen auf dem Vi-CELL BLU nach Auswahl der am ehesten gleichwertigen Standardparameter für den Zelltyp (in der Regel **Mammalian**) analysieren. Die Daten zur späteren Auswertung exportieren.
6. Mit der Option für die erneute Zelltyp-Analyse (siehe Abb. 1) die Zelltyp-Parameter des Vi-CELL BLU anpassen, bis die Zellkonzentration innerhalb von 10 % und die Vitalität innerhalb von 5 % um den entsprechenden mit dem Vi-CELL XR ermittelten Wert liegt. Die angepassten Zelltypen speichern.

* Die Ergebnisse können je nach Zelllinie bzw. Konzentrations- und Vitalitätsbereich variieren.



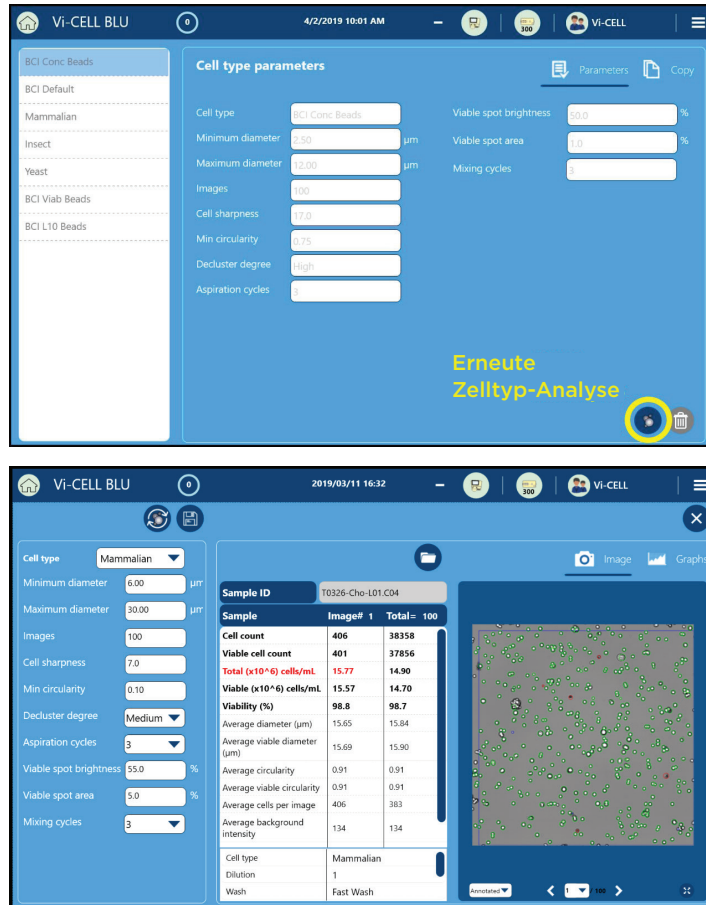


Abbildung 1: Erneute Zelltyp-Analyse

Empfehlungen zur Anpassung der Zelltyp-Parameter

1. Anhand der kommentierten Bilder in der Vi-CELL XR und Vi-CELL BLU Software bestimmen, welche Parameter angepasst werden müssen.
2. Mit Min.- und Max.-Durchmesser sowie Decluster-Grad verändern sich höchstwahrscheinlich auch der Zellkonzentrationswert und der ermittelte durchschnittliche Durchmesser. Diese Parameter haben den größten Einfluss darauf, welche Objekte in die Gesamtzahl (Analysepopulation) einbezogen werden. Die Kommentarfunktion nutzen, um festzulegen, ob kleine oder große Zellen blau eingekreist werden sollen.
3. Die **viable spot brightness** für lebensfähige Zellen entspricht der Vitalität; in Bildkommentaren festlegen, ob tote Zellen grün oder lebende Zellen rot eingekreist werden sollen (siehe zweites Bild).
Es ist zu beachten, dass die **viable spot brightness** für lebensfähige Zellen umgekehrt proportional zum prozentualen Anteil an lebensfähigen Zellen ist, da eine Erhöhung der Helligkeitsschwelle für lebende Zellen die Anzahl der als lebend eingestufteten Zellen reduziert.
4. Der Decluster-Grad kann erhöht werden, wenn verklumpte Zellen nicht korrekt gezählt werden, und verringert werden, wenn Klumpen zu viele Zellen aufweisen. Es ist zu beachten, dass bei einer Änderung des Decluster-Grads die gesamte Bildreihe gespeichert werden muss, um korrekte Ergebnisse zu erhalten, da die Bilder zur Generierung einer neuen Objektpopulation erneut analysiert werden müssen.
5. Zirkularität und Schärfe können erhöht werden, um Zelltrümmer auszufiltern. Auch die Spotfläche für lebensfähige Zellen kann hierzu genutzt werden.

Wenn sich bei der Zellzählung erhebliche Abweichungen zwischen beiden Geräten zeigen, die Analysebilder prüfen und sicherstellen, dass keine übermäßige Verklumpung vorliegt und Zellen nicht unzureichend gefärbt wurden. Bestimmte Zelltypen wie etwa adhären wachsende Zellen können durchaus in Clustern vorliegen, während Hefen und andere Organismen mit Zellwänden möglicherweise das Trypanblau schlecht aufnehmen. In solchen Fällen kann es erforderlich sein, die Proben mit folgenden Änderungen nochmals zu analysieren:

1. Erhöhung der Zahl der Aspirationszyklen, um Zellklumpen zu trennen
2. Erhöhung der Zahl der Trypanblau-Mischzyklen, um eine längere Färbedauer zu erreichen, wenn tote Zellen blass aussehen oder nicht rot eingekreist werden

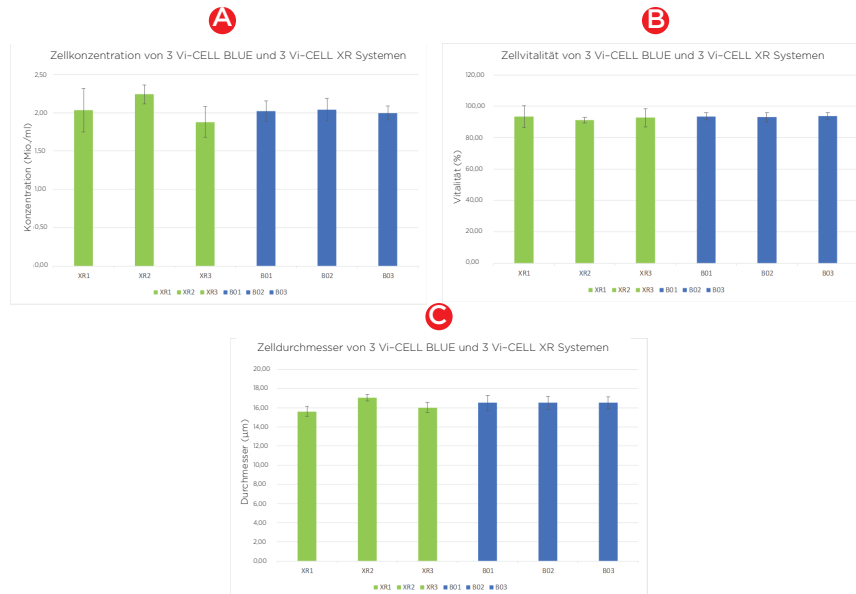
Zur Bewertung der Geräteabgleichmethode wurden Zellen auf 3 Vi-CELL BLU und 3 Vi-CELL XR Systemen mit denselben nachstehend aufgeführten Standard-Zellprofilen analysiert. Das Ziel besteht darin, die Systeme bei Konzentration und Durchmesser auf eine Abweichung von maximal $\pm 5\%$ (Spanne 10 %) und bei Vitalität auf eine Abweichung von maximal $\pm 2,5\%$ (Spanne 5 %) abzugleichen. Dieser Toleranzgrad wurde gewählt, da er innerhalb der Leistungskriterien für das Vi-CELL BLU Gerät liegt. Die Anwender können eigene Werte für den Abgleich bestimmen, doch die vorstehenden allgemeinen Empfehlungen bringen die Messwerte in den Bereich innerhalb der statistisch akzeptablen Grenzwerte.

Ergebnisse

CHO-Zellen

CHO-Zellen wurden auf dem Vi-CELL XR und dem Vi-CELL BLU analysiert. Auf dem Vi-CELL XR fand ein CHO-Standardzellprofil Anwendung, auf dem Vi-CELL BLU das Säuger-Standardzellprofil.

	Vi-CELL BLU	Vi-CELL XR
Zelltyp	Mamallian	CHO
Minimaler Durchmesser (μm)	6	6
Maximaler Durchmesser (μm)	30	70
Bilder	100	50
Zellschärfe	7	100
Minimale Zirkularität	0,1	0
Decluster-Grad	Mittel	Niedrig
Aspirationszyklen	3	1
Spothelligkeit lebensfähiger Zellen (%)	55	75
Spotfläche lebensfähiger Zellen (%)	5	5
Mischzyklen	3	3



Die Werte der Vi-CELL BLU Geräte entsprachen den Werten der Vi-CELL XR Systeme innerhalb der statistischen Grenzen. Die Durchschnittswerte für Konzentration, Vitalität und Durchmesser der Populationen der beiden Systeme wichen um maximal $\pm 5\%$ voneinander ab und lagen damit im Sollbereich. In diesem Fall ist keine weitere Verfeinerung erforderlich, da der Säuger-Standardzelltyp hier gut funktioniert.

	Konzentration $\pm 5\%$	Vitalität $\pm 2,5\%$	Durchschn. Durchm. $\pm 5\%$
Durchschnitt Vi-CELL XR	2,05	92,46	16,23
Durchschnitt Vi-CELL BLU	2,02	93,51	16,52
Differenz zum XR-Durchschnitt	-1,66 %	1,14 %	1,79 %

HeLa-Zellen

HeLa ist ein in der zellbiologischen Forschung häufig eingesetzter Zelltyp; anders als CHO- und Jurkat-Zellen wachsen HeLa-Zellen jedoch adhärent auf einem festen Substrat und müssen mittels Trypsinierung in Suspension gebracht werden. Daher neigen sie stärker zur Verklumpung als Suspensionszellen. Auch die Größenverteilung ist anders als bei CHO-Zellen.

Zur Bewertung des Säuger-Standardzellprofils im Vergleich mit anderen Säuger-Zelllinien wurden HeLa-Zellen in Kulturflaschen gezüchtet, dann abgelöst und in einer Konzentration von ca. 6 Mio./ml suspendiert.

Die Zellen wurden auf 3 Vi-CELL BLU und 2 Vi-CELL XR Systemen mit denselben oben aufgeführten Standardprofilen analysiert. Zum Abgleich wurden die Durchschnittswerte der Systeme verwendet. Das Ziel besteht darin, die Systeme bei Konzentration und Durchmesser auf eine Abweichung von maximal $\pm 5\%$ (Spanne 10 %) und bei Vitalität auf eine Abweichung von maximal $\pm 2,5\%$ (Spanne 5 %) abzugleichen. Dieser Toleranzgrad wurde gewählt, da er innerhalb der Leistungskriterien für das Vi-CELL BLU Gerät liegt. Die Anwender können eigene Werte für den Abgleich bestimmen, doch die vorstehenden allgemeinen Empfehlungen bringen die Messwerte in den Bereich innerhalb der statistisch akzeptablen Grenzwerte.

	Vi-CELL BLU	Vi-CELL XR
Zelltyp	Säuger	CHO
Minimaler Durchmesser (µm)	6	6
Maximaler Durchmesser (µm)	30	70
Bilder	100	50
Zellschärfe	7	100
Minimale Zirkularität	0,1	0
Decluster-Grad	Mittel	Niedrig
Aspirationszyklen	3	1
Spothelligkeit lebensfähiger Zellen (%)	55	75
Spotfläche lebensfähiger Zellen (%)	5	5
Mischzyklen	3	3

Zusätzlich zum Standard wurden die Daten mit einer Kombination verschiedener Zellprofilvarianten erneut analysiert, um einen Einstellungsbereich auf Basis des Säuger-Standardprofils festzulegen, um damit wiederum zu ermitteln, ob ein präziserer Abgleich zwischen Vi-CELL BLU und Vi-CELL XR erreicht werden kann. Diese Profile sind nachstehend dargestellt.

Zelltyp	MT01	MT02	MT03	MT04	MT05	MT06	MT07	MT08	MT09	MT10
Min. Durchmesser (µm)	6	6	6	6	6	6	6	6	5	5
Max. Durchmesser (µm)	20	40	20	40	20	40	20	40	20	20
Bilder	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Zellschärfe	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Minimale Zirkularität	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Decluster-Grad	Hoch	Hoch	Hoch	Hoch	Niedrig	Niedrig	Niedrig	Niedrig	Niedrig	Keiner
Aspirationszyklen	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Spothelligkeit lebensfähiger Zellen (%)	40	40	90	90	40	40	90	90	75	75
Spotfläche lebensfähiger Zellen (%)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Mischzyklen	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3



In der Tabelle ist die prozentuale Differenz der Werte des Vi-CELL BLU gegenüber den Werten des Vi-CELL XR für die verschiedenen Zellprofile angegeben.

Zellprofil	Konzentration ±5 %	Vitalität ±2,5 %	Durchschn. Durchm. ±5 %
Säuger	-0,01 %	2,73 %	-2,53 %
MT01	4,82 %	9,84 %	-2,84 %
MT02	5,00 %	9,52 %	-1,85 %
MT03	4,34 %	-7,42 %	-2,46 %
MT04	2,23 %	-7,63 %	-1,58 %
MT05	5,35 %	9,54 %	-1,08 %
MT06	5,92 %	9,82 %	-0,08 %
MT07	5,26 %	-6,30 %	-0,68 %
MT08	6,40 %	-7,31 %	0,25 %
MT09	2,32 %	-1,81 %	-3,19 %
MT10	-13,43 %	-3,04 %	-1,67 %

Aus der obigen Tabelle ist ersichtlich, dass das Säuger-Standardprofil bei Konzentration, Vitalität und durchschnittlichem Durchmesser eine gute Übereinstimmung zeigt. Das Zellprofil MT09 scheint jedoch ein besserer Zelltypkandidat zu sein, da seine Werte bei allen 3 Parametern eine höhere Übereinstimmung liefern.

Falls eine noch genauere Übereinstimmung gewünscht wird, könnte das MT09-Profil weiter verfeinert werden. Eine Änderung des Zellprofils wie unten dargestellt erhöht die Übereinstimmung bei Vitalität und Durchmesser noch weiter.

Zelltyp	MT09	MT09*
Min. Durchmesser (µm)	5	5
Max. Durchmesser (µm)	20	25
Bilder	100	100
Zellschärfe	7	7
Minimale Zirkularität	0,1	0,1
Decluster-Grad	Niedrig	Niedrig
Aspirationszyklen	3	3
Spothelligkeit lebensfähiger Zellen (%)	75	70
Spotfläche lebensfähiger Zellen (%)	5	5
Mischzyklen	3	3

Zellprofil	Konzentration ±5 %	Vitalität ±2,5 %	Durchschn. Durchm. ±5 %
MT09	2,32 %	-1,81 %	-3,19 %
MT09*	2,58 %	-1,25 %	-1,71 %

Schlussfolgerungen

Zum Abgleich der Werte zwischen einem Vi-CELL XR und einem Vi-CELL BLU empfehlen wir, mit dem Standardzellprofil der Vi-CELL BLU-Software zu beginnen, das dem zu analysierenden Zelltyp am ehesten entspricht. Eine weitere Feinabstimmung ist nur erforderlich, wenn die Ergebnisse um mehr als die gewünschte Spanne (z. B. 5 % oder 10 %) voneinander abweichen.