



10. Nationales Biobanken-Symposium, Berlin

Externe Qualitätssicherung des Biobankings von mononukleären Zellen aus peripherem Blut: Design und Erkenntnisse der GBN-Pilotstudie 2020

Gunter Wolf^a, Christiane Hartfeldt^b, Heidi Altmann^c, David Poitz^{a,c}



Agenda

I Einführung

I PBMC-Ringversuch (Pilot 2020)

I Ausgewählte Ergebnisse

- Lagerung (Versand) der Primärprobe
- Lagerung (Versand) der Kryoprobe
- Vitalitäts-Bestimmung
- PBMC-Zusammensetzung
- Inter-/Intra-Biobank-Variabilität

I Fazit und Ausblick

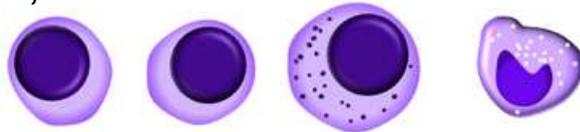


PBMC

mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Syn.: MNC)

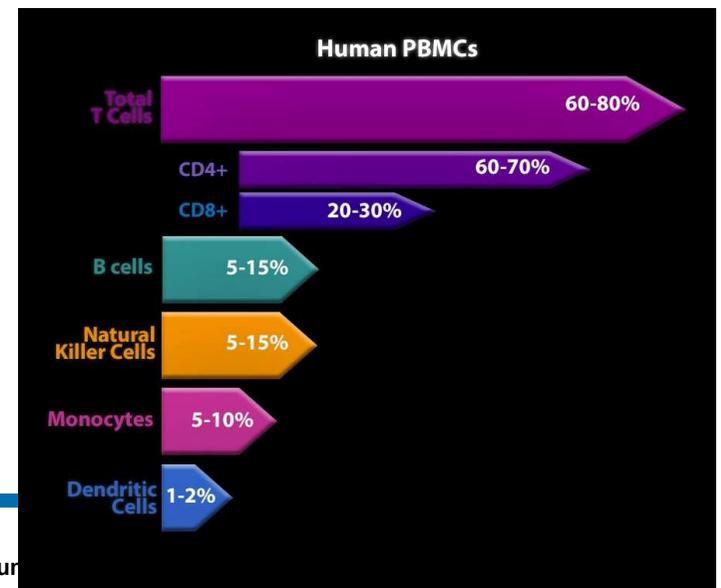
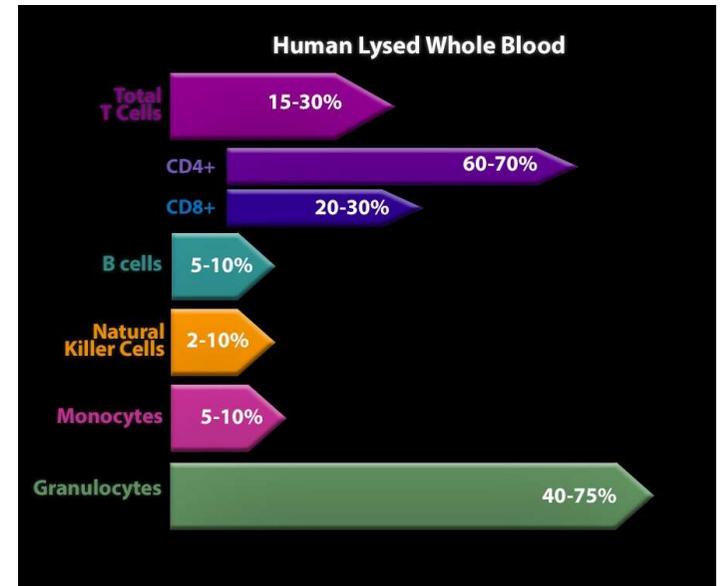
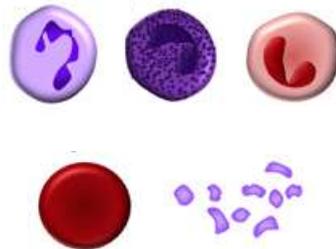
Blutzellen mit einem einzigen rundlichen Zellkern

- [T-, B-, NK-] Lymphozyten,
- Monozyten,
- (dendritische Zellen)



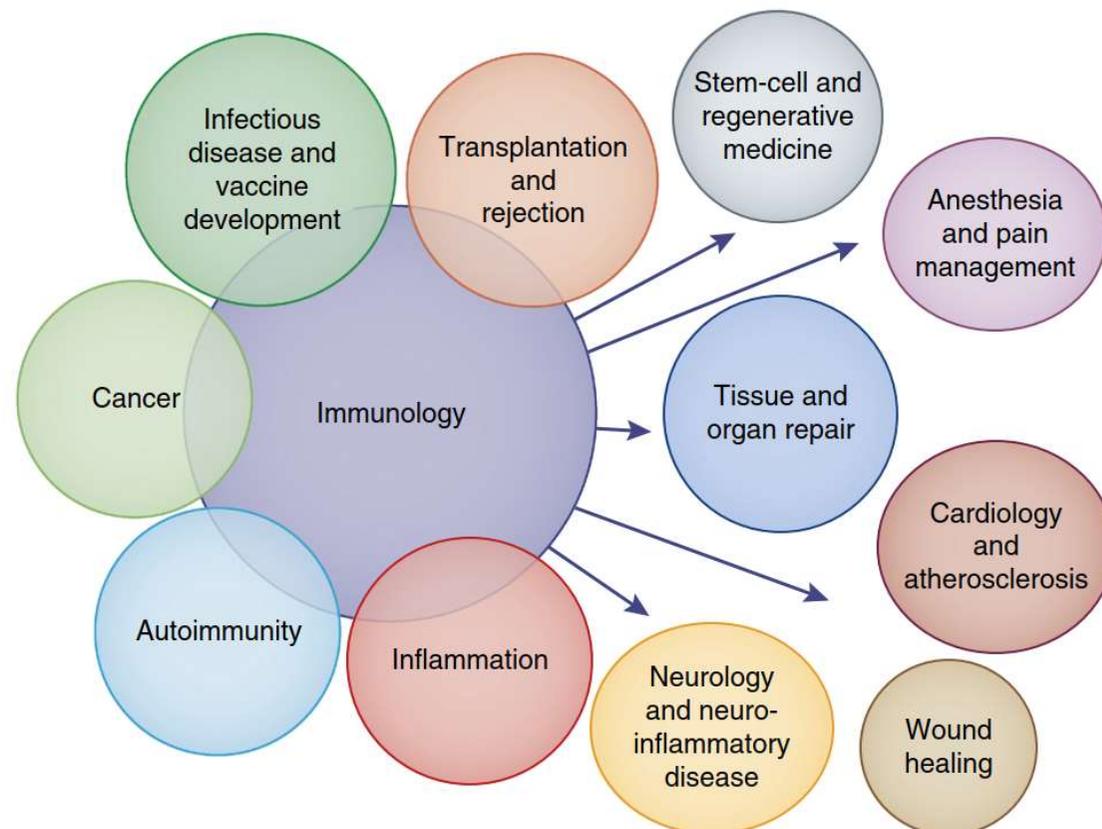
Anreicherung aus Vollblut durch Separation von anderen Blutzellen (Granulozyten, Erythrozyten, Thrombozyten) und Plasma;

- z.B. durch
- Dichtegradientenzentrifugation,
- Antikörper-basierte Selektion

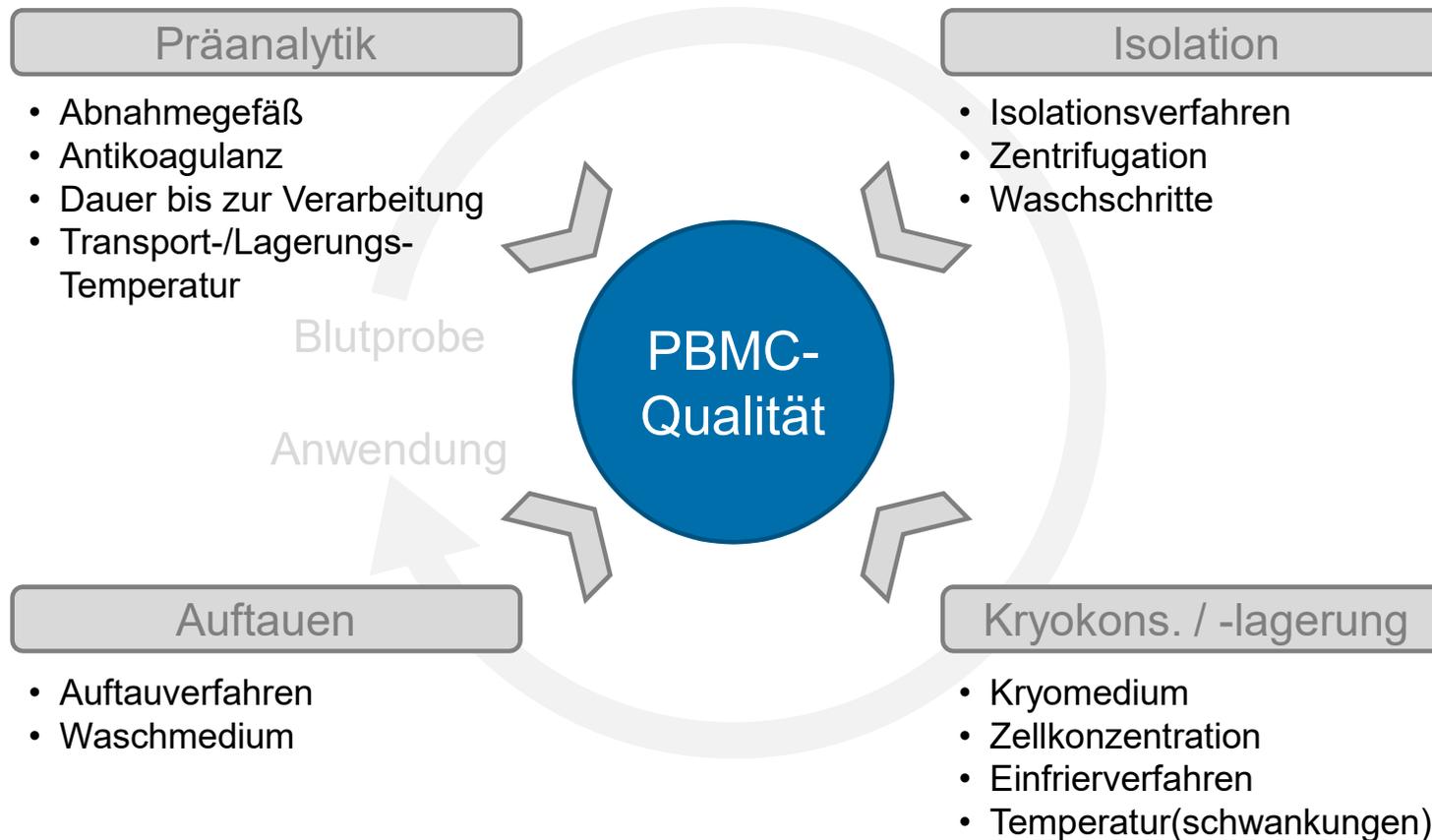


Immunologische Anwendungen

- PBMC nehmen an einer Vielzahl immunologischer Vorgänge teil
- effizientes Zusammenspiel und Kommunikation spielen eine wichtige Rolle
- bedeutendes Werkzeug in der Erforschung des Immunsystems
- hohe Qualität der PBMC ist Grundvoraussetzung zur Gewinnung valider Ergebnisse
 - möglichst realitätsnah
 - ausreichende Anzahl und Vitalität
 - adäquate Komposition
 - zelluläre Funktion vorhanden



Einflussfaktoren auf PBMC-Qualität



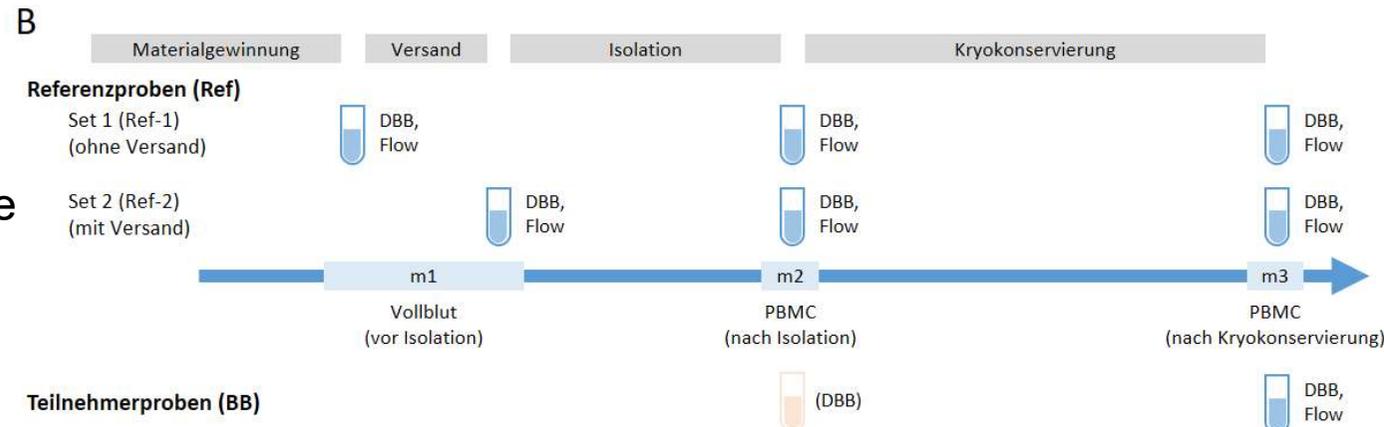
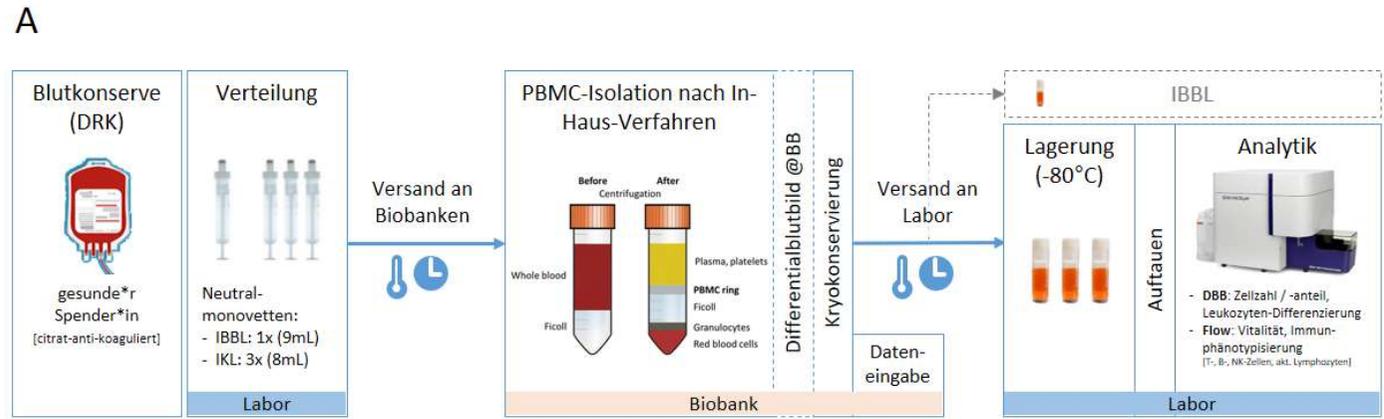
PBMC-Ringversuch (Pilot 2020)

Ziele und Motivation

- Etablierung eines umfassenden „Qualitätssicherungs-Programms“ für das Biobanking von PBMC-Proben
 - Unterstützung der Biobanken bei Qualitätssicherung
 - hohe Proben-Qualität (im Netzwerk) fördern
- Pilotstudie unter GBA-Biobanken
- sinnvolle Erweiterung bestehender Angebote (z.B. IBBL)

Design

- Versuchsaufbau „simuliert“ Aspekte des kompletten Biobanking-Prozesses von Materialgewinnung bis Kryokonservierung
 - Temperatur- und Zeit-überwacher Versand einheitlichen Materials an Biobanken
- PBMC-Isolation nach lokalem Verfahren (mehrfache Bearbeitung)
- zentrale Analytik und Datenanalyse
 - DBB: Zellzahlen & -populationen, Leukozytendifferenzierung
 - Flow: Vitalität, Immunphänotypisierung (T-, B-, NK-Zellen)



Teilnehmerkollektiv

13 Biobanken (GBA)

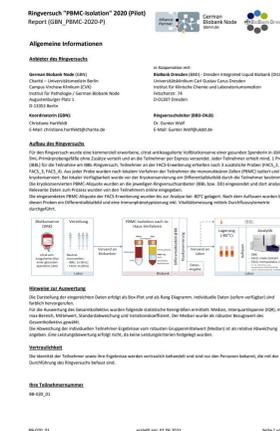
Schema	Biobanken	Teilnahmen	Proben
gesamt	13	21	54
IBBL	13	21	21
+ GBN	10	11	33

	Teilnahmen	Proben
+ GBN	11	33
mit DBB (vor Ort)	7	21
ohne DBB (vor Ort)	4	12

+ 9 Referenzproben
(Durchlaufen aller Prozessschritte
[außer „realer“ Transport])

umfassender
Report

Datenbasis für
Auswertung

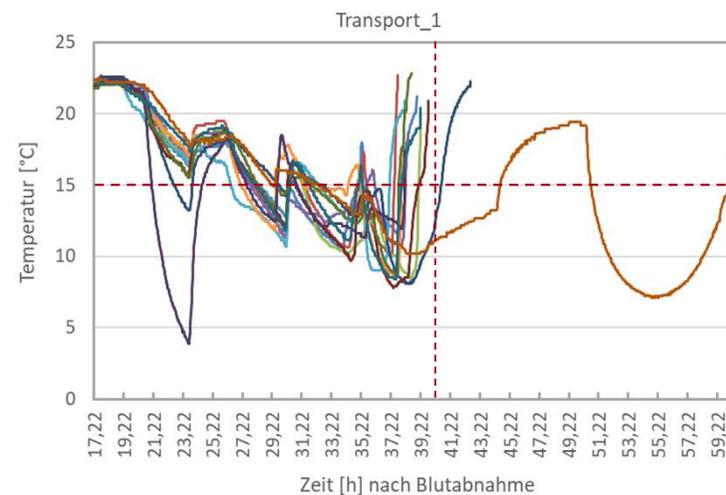
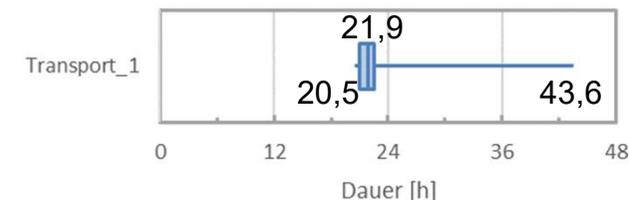


Transport der Primärproben

- Versand bei Umgebungstemperatur (November 2020)
- Dauer: ca. 21,9 h
- Eingang: ca. +38,8 h
- Temperaturprofile über Transport
- Bemerkungen:
 - stark verzögerter Eingang (1/9)
 - verbreitet Temperaturabsenkung auf unter 15°C

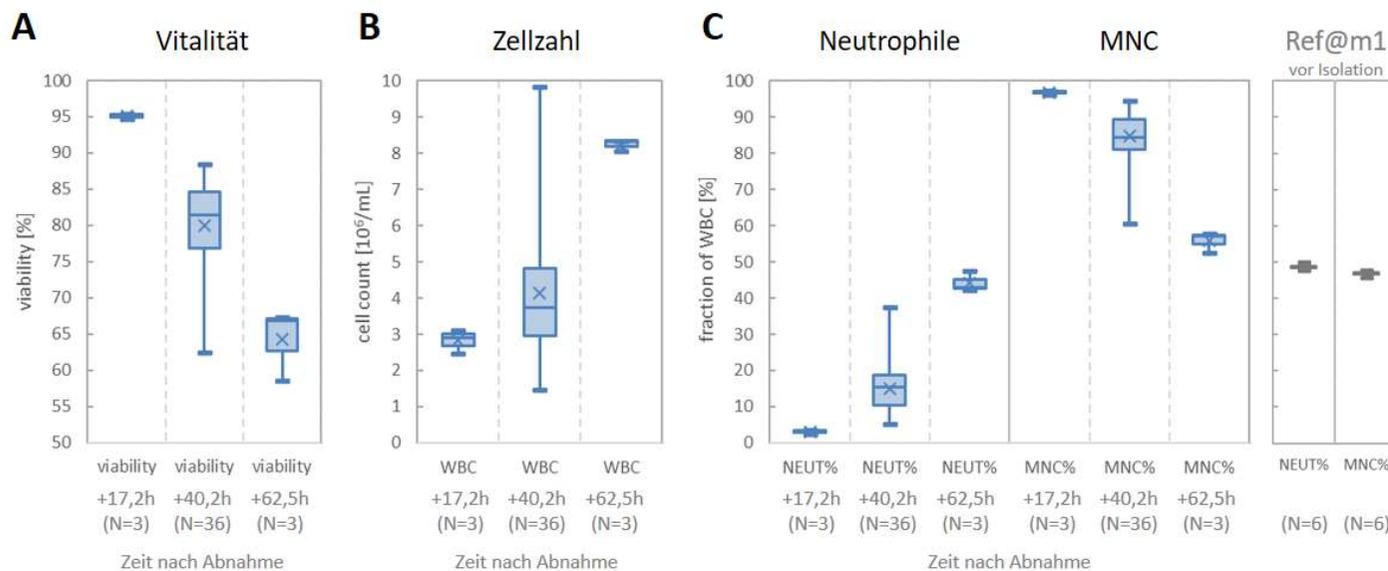
Temperatur	Transport_1
mean	14,6 bis 16,5
sd	3,5 bis 4,5
min	3,9 bis 10,8
max	22,1 bis 22,8
MKT(ΔH 83,144)	15,7 bis 17,2

MKT Mittlere kinetische Temperatur



Zeit bis zur Verarbeitung

- Vitalität nimmt ab
- Zellzahl (WBC) nimmt (scheinbar) zu, allerdings
 - MNC-Anteil sinkt
 - Neutrophilen-Anteil steigt (→ nicht gewünscht; keine MNC)



ineffizientere Abtrennung im Dichtegradienten nach Dichteverminderung aufgrund Neutrophilen-Aktivierung (low-density neutrophils) [1]



Neutrophilen-Kontamination

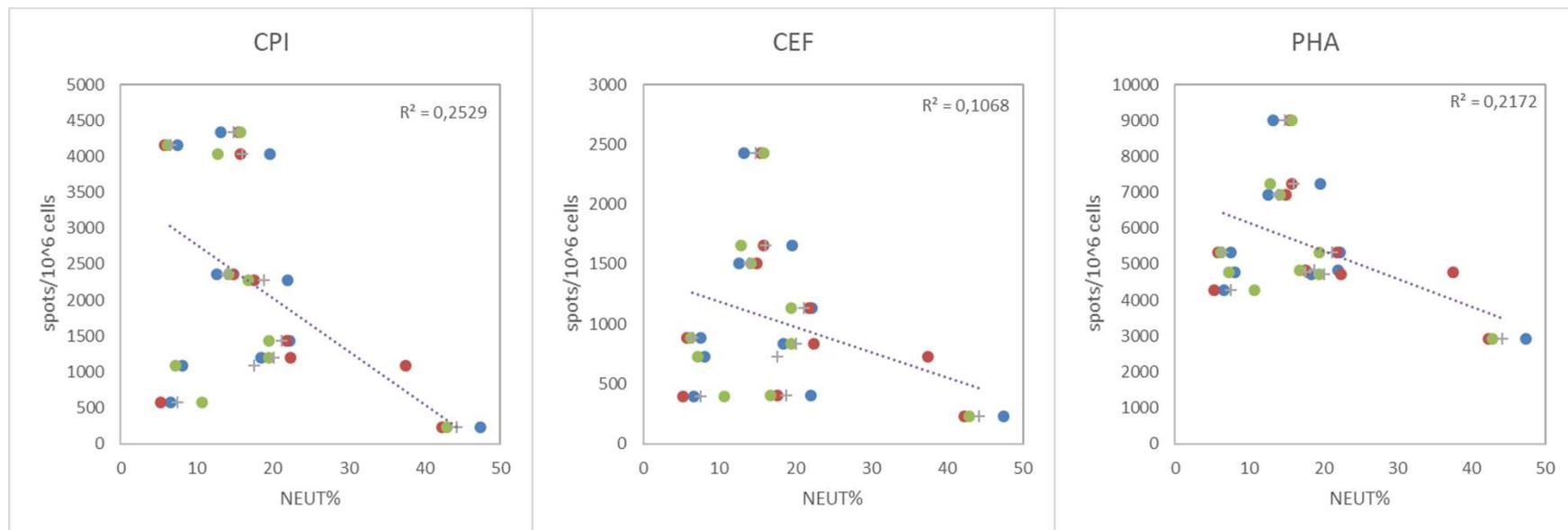


Funktionseinschränkung !!



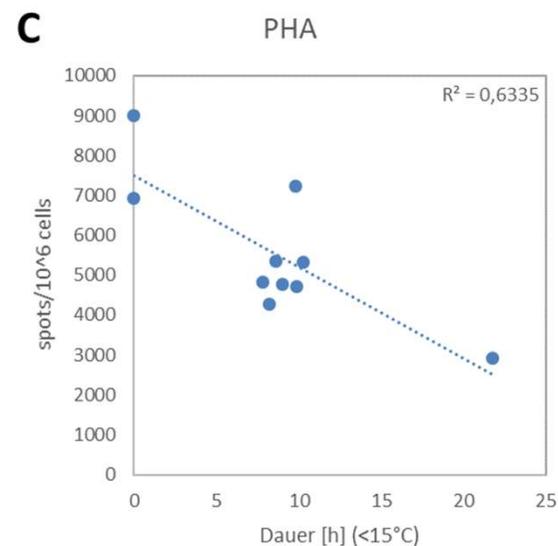
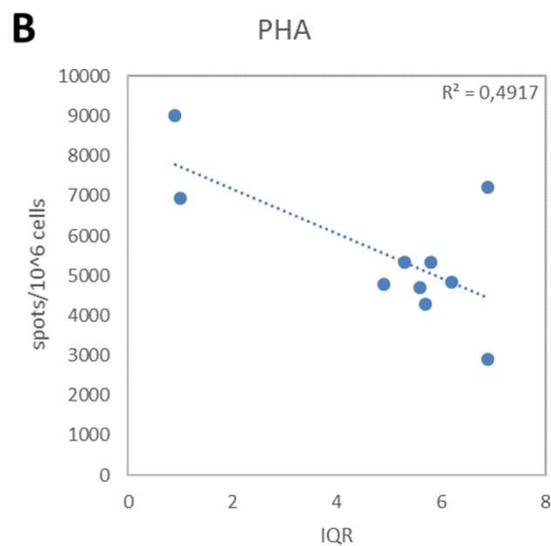
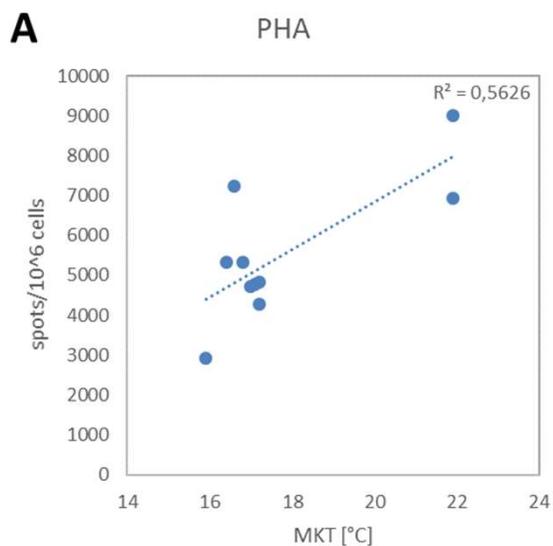
Neutrophilen-Kontamination und PBMC-Funktion

- Korrelation des Neutrophilengehalts mit verfügbaren Funktionsdaten (IBBL)
- Trend bzgl. eingeschränkter PBMC-Funktion (ELISPOT) bei steigendem Neutrophilen-Gehalt erkennbar (vergleichbar zu Literaturdaten [1])
 - zusätzliche Einflussfaktoren sind wahrscheinlich



Transport-Temperatur und PBMC-Funktion

- Korrelation der Temperaturdaten mit verfügbaren Funktionsdaten (IBBL)
- PBMC-Funktion (ELISPOT) eingeschränkt bei
 - geringerer Temperatur (MKT)
 - höherer Schwankungsbreite der Temperatur (IQR)
 - längerer Dauer unter 15°C



Fazit: Lagerung der Primärprobe

- Dauer bis Verarbeitung möglichst kurz (<8h) halten
 - falls schnelle Bearbeitung nicht möglich: sofortige 1+1-Verdünnung mit PBS verlängert akzeptables Zeitfenster (bis ca. 24h) ^[1]
- Lagerung vor Verarbeitung bei Raumtemperatur
 - niedrige Temperaturen vermeiden
 - Versand bei 15-30°C (ggf. Wärmepack nutzen)

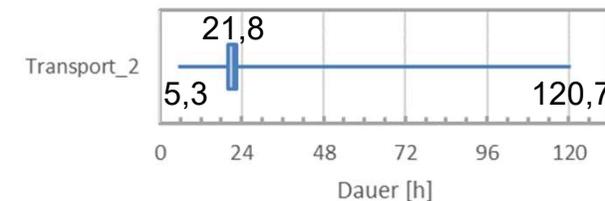


Transport der Kryoproben

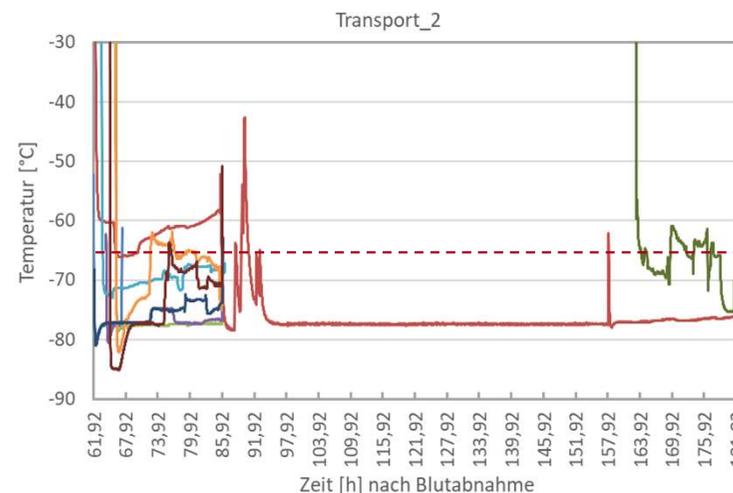
- Versand auf Trockeneis
- Dauer: ca. 21,8 h
- Eingang: ca. +86,0 h
- Temperaturprofile über Transport

Temperatur	Transport_2
mean	-77,4 bis -66,8
sd	1,6 bis 6,6
min	-85,1 bis -72,9
max	-62,9 bis -42,6
MKT(ΔH 83,144)	-75,9 bis -65,3

MKT Mittlere kinetische Temperatur



- Auffälligkeiten:
 - z.T. Temperaturen über -65°C
 - Proben nicht korrekt im Trockeneis verpackt (5/9)

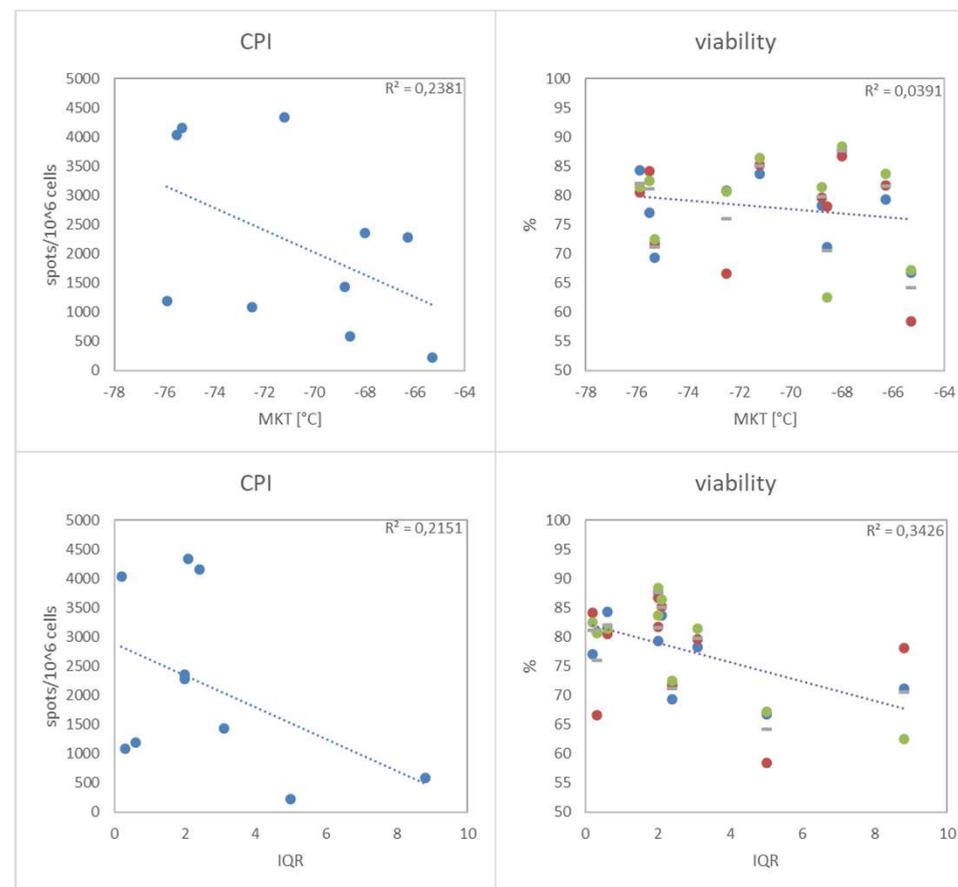


Einfluss der Kryolagerung

- hohe Temperatur (MKT) und Temperaturschwankungen (IQR) können PBMC-Funktion beeinträchtigen
 - CAVE: keine direkten Daten des Kryoversands an IBBL verfügbar (Analogieschluss)
- Temperaturschwankungen (IQR) können Vitalität beeinflussen

Fazit:

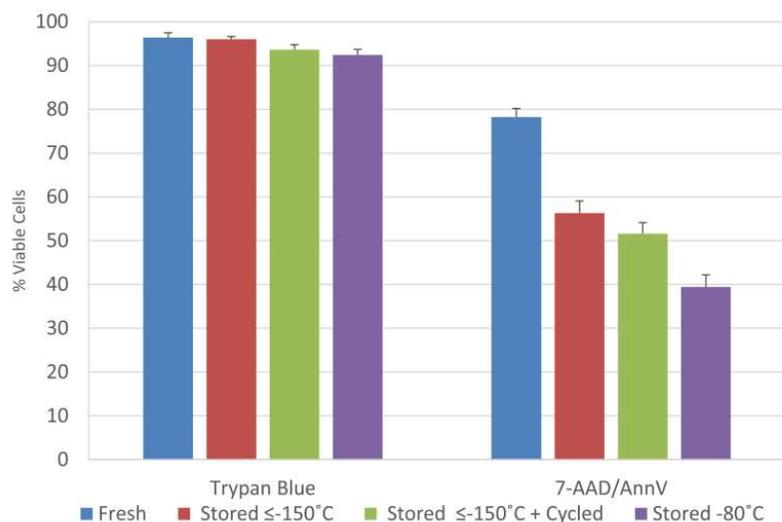
- Versand-Temperatur unter -65°C halten
 - Korrekte Verpackung in Trockeneis !!
 - Proben komplett im Trockeneis einschließen
 - Luftraum minimieren



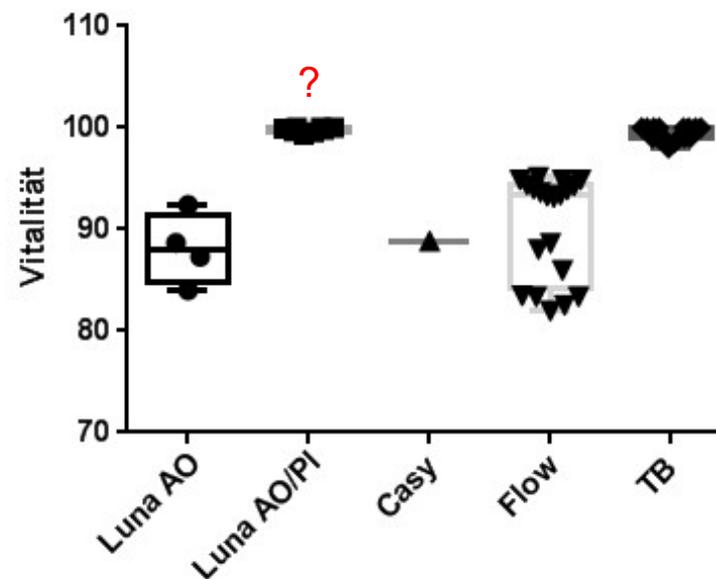
Vitalität: Bestimmungsmethoden

- Ergebnisse abhängig von Bestimmungsmethode
 - unterschiedliche Färbemechanismen (lebend vs. tot)
 - Trypan Blau überschätzt Vitalität (besonders bei niedriger Vitalität und nach Kryokonservierung)
 - unzuverlässige Probencharakterisierung

Vitalitätsmessmethode	Anzahl	%
Acridine Orange/ Propidium Iodide	3	23%
Flow Cytometry	3	23%
Trypan Blue	4	31%
Andere	3	23%

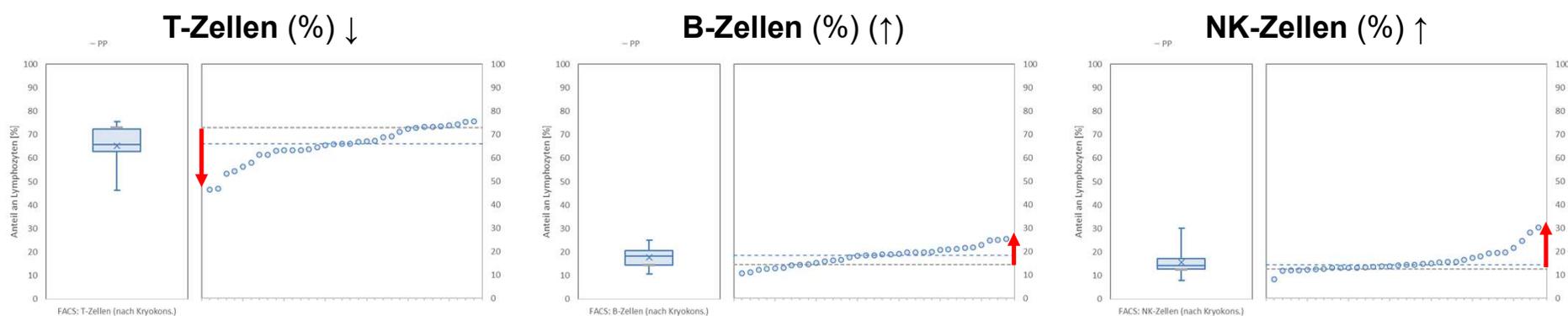


Yang et al., BMC Immunology (2016) 17:6



PBMC-Zusammensetzung

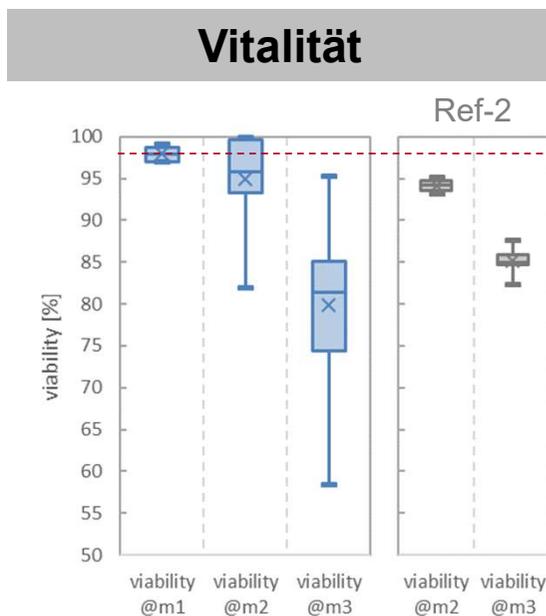
- zelluläre Zusammensetzung der PBMC ist variabel und weicht z.T. deutlich von der Primärprobe ab



- Ursachen können vielfältig sein (hier nicht im Detail evaluierbar):
 - Verzögerung und Kühlung vor Bearbeitung
 - individuelle Schritte im Isolationsverfahren
 - Kryokonservierung
- Effekte in Literatur mit variablem Erscheinungsbild (bzgl. Richtung und Ausmaß) beschrieben

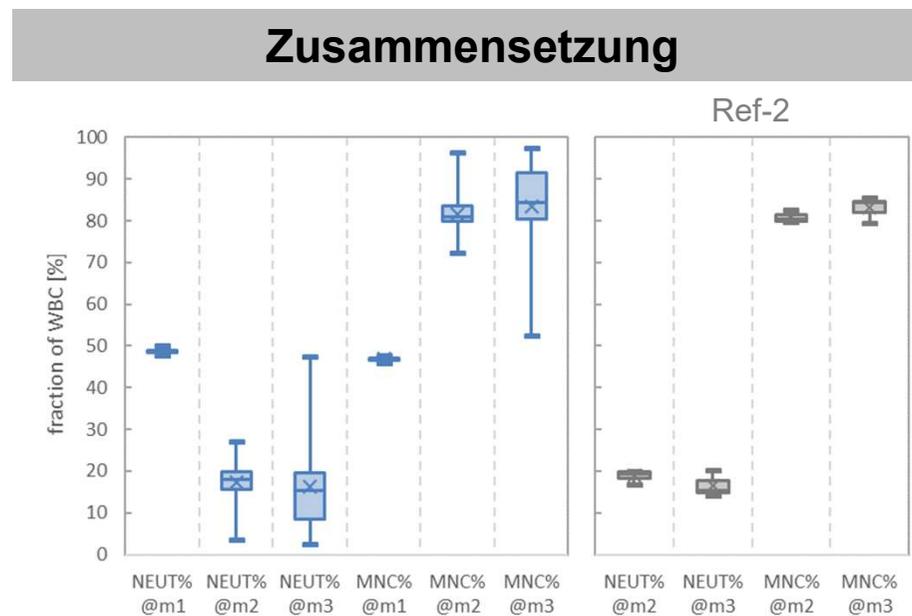
Variabilität

- höhere Variabilität zwischen den Biobanken als innerhalb einer individuellen Biobank
 - verfahrensbedingte Variabilität in den Referenzproben ca. 1,1-2,6%



Anova:

Intra-BB-CV%	1,3%	5,3%
Inter-BB-CV%	6,7%	10,1%



9,5%	40,2%	2,3%	7,4%
21,3%	47,5%	5,6%	8,5%



Zusammenfassung

- Ergebnisse (PBMC-Qualität) beeinflusst durch:
 - Lagerung (Transport) der Primärproben: Dauer, Temperatur
 - Lagerung (Transport) der Kryoproben: Temperatur(schwankungen)
 - Vitalitäts-Bestimmungsmethode
- PBMC-Zusammensetzung kann beeinträchtigt werden
- Variabilität zwischen Biobanken größer als innerhalb einer Biobank

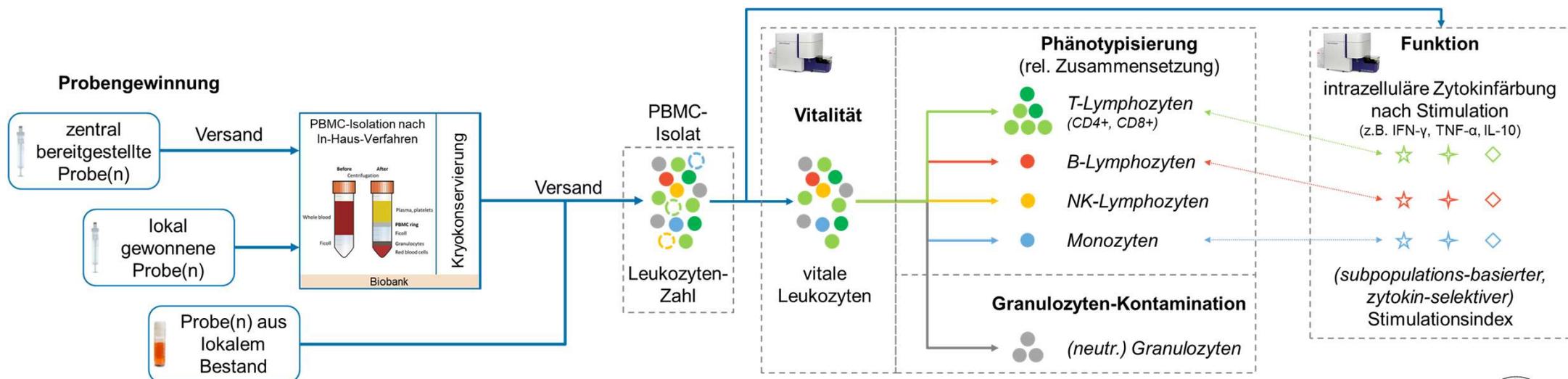
Fazit

- Potential und Machbarkeit eines umfassenden Qualitätssicherungsprogramms zur Beurteilung des Biobankings von PBMC wurde gezeigt
- Zur umfassenden Beurteilung der PBMC-Qualität und deren Eignung für immunologische Anwendungen sind essentiell:
 - Zellzahl und Vitalität
 - PBMC-Zusammensetzung: Neutrophilen-Anteil (!)
 - Funktionstestung (!!)
- CAVE: detaillierte Leistungsbewertung war nicht möglich (geringe Fallzahl, fehlende Bewertungskriterien)
 - ABER: Trends sind dennoch erkennbar (in Übereinstimmung mit Literaturdaten)
 - DAHER: Weiterentwicklung des Programms angestrebt



Ausblick

- I Erweiterung der Ringversuchsmethodik (Förderung bewilligt)**
 - Optimierung der analytischen Verfahren (Durchflusszytometrie)
 - Aufbau von Methoden zur funktionellen Testung (intrazelluläre Zytokinfärbung)
 - Definition von validen Qualitätskriterien / -indikatoren zur Leistungsbewertung
- II Erweiterung der Probengewinnungstrategie**
 - verschiedene Schwerpunkte der Ringversuchsrunden möglich





Vielen Dank für die Aufmerksamkeit.

Kontakt:

Dr. Gunter Wolf

Telefon: 0351 458-4157

Telefax: 0351 458-884157

E-Mail: Gunter.Wolf@ukdd.de

Internet: www.uniklinikum-dresden.de/labor

Adresse:

Universitätsklinikum Carl Gustav Carus

an der TU Dresden AöR

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (IKL)

Haus 53

Fetscherstraße 74, 01307 Dresden