

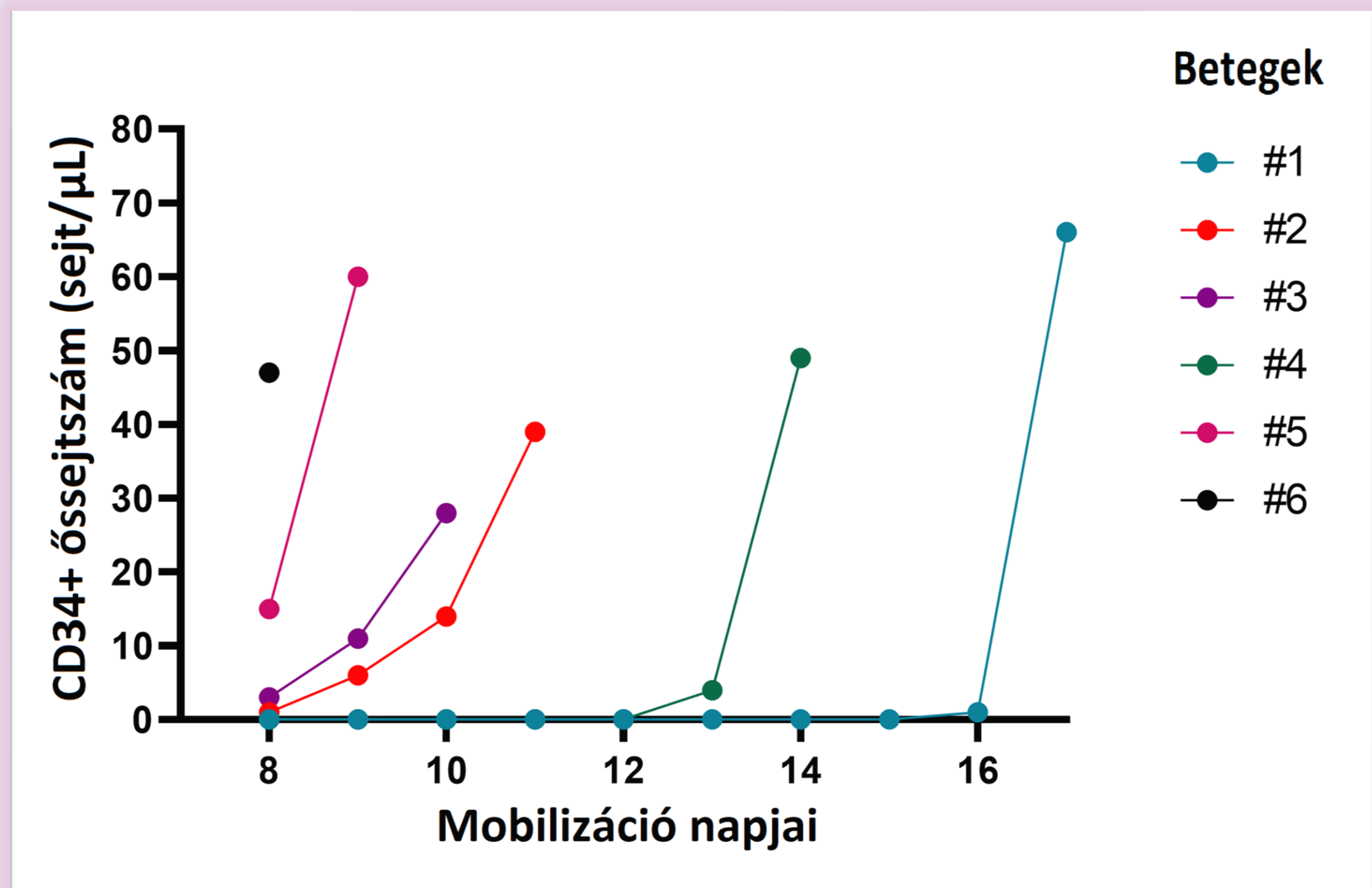
Gyöngyalapú és volumetriás abszolút sejtszám-meghatározások összehasonlítása áramlási citometriával

Bihari György¹, Ferencz Kamilla¹, Demeter Flóra¹, Vadicsku Dorina¹, Kajdácsi Erika^{1,2}, Masszi Tamás¹, Cervenak László¹

1 Semmelweis Egyetem, Belgyógyászati és Hematológiai Klinika, Budapest; 2 HUN-REN-SE Immunológiai és Hematológiai Kutatócsoport

Bevezetés és célkitűzés

A hematológiai diagnosztika és terápiás sejt- és gyógyszermonitorozás számos alkalommal követeli meg az abszolút sejtszám meghatározását az áramlási citometriás mérésekben. Munkánk során az abszolút sejtszám-meghatározást az autológ hemopoetikus őssejt-transzplantációt (ASCT-t) megelőző mobilizáció monitorozására (**1. ábra**), az őssejtferezis hatékonyságát a graftból történő CD34+ őssejt meghatározására, illetve az ASCT-t megelőző életképesség meghatározására használjuk. Erre a legelterjedtebb módszerek a gyöngy általi sejtszám-meghatározáson alapulnak. Bizonyos gyöngyalapú módszerek a gyártó által meghatározott hibahatára 10%, de a tapasztalatok alapján ez inkább a 20% felé tendál. Ebből adódóan egyazon beteg nyomon követése során, a mérésekből adódó szórás elérheti akár a 40%-os eltérést is. Az általunk tapasztalt rendkívül magas szórás miatt célunk, a különböző módszerek összehasonlítása mellett, egy másik módszer kialakítása volt, amellyel pontos és alacsony szórású, olcsó és egyszerű abszolút sejtszám meghatározására vagyunk képesek.

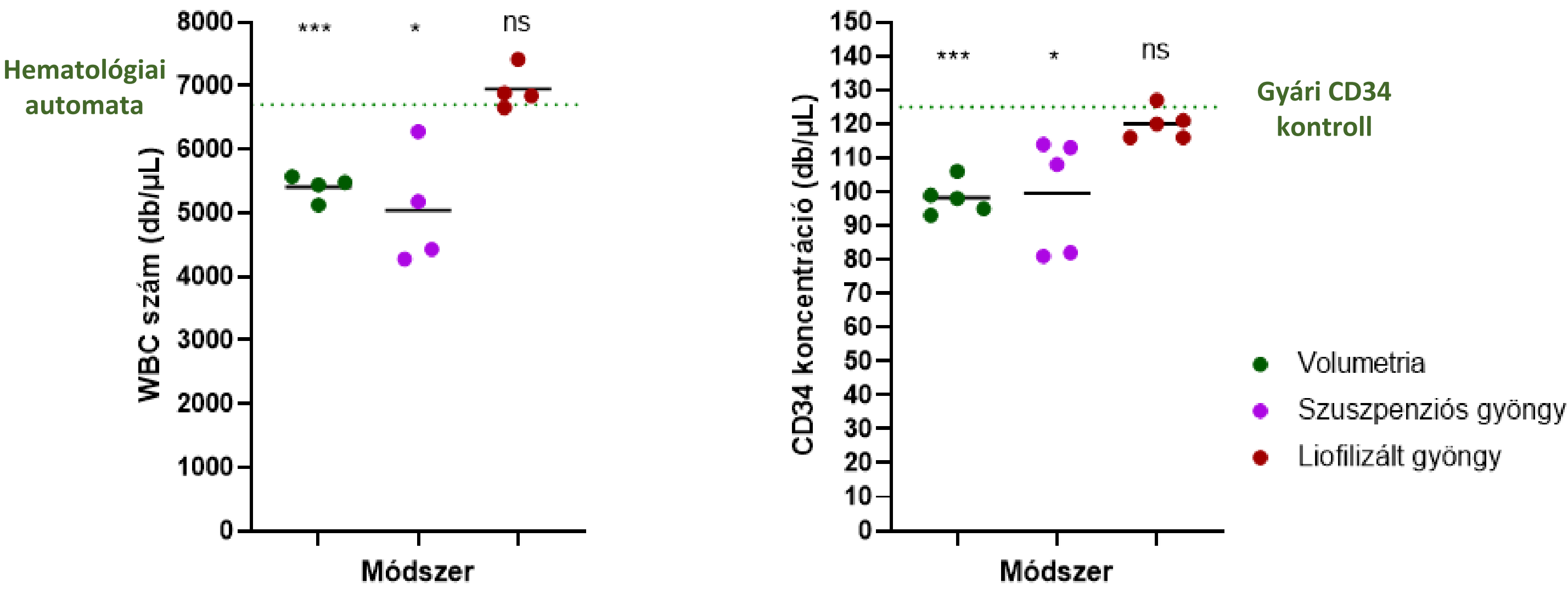


1. ábra. A betegek CD34+ koncentrációjának kinetikája a mobilizáció során. A myelomás és lymphomás betegek ferezis időpontjának kiszámításához a CD34+ abszolút sejtszámot a mobilizálás 8. napjától kezdve naponta meghatároztuk. A mobilizáció sikerességének függvényében láthatjuk a CD34+ sejtszám növekedését. A küszöbérték elérése tág időintervallumban történhet, de mindenképp pontos CD34+ szám meghatározást igényel.

Eredmények

- A mérések reprodukálhatóságát vizsgálva (és ezt CV%-kal jellemezve) a volumetriás és gyöngy alapú módszerekből több párhuzamost hasonlítottunk össze, amiből kiderült, hogy a volumetriás és a liofilizált gyöngyöket használó módszer jóval precízebbnek bizonyult a szuszpenziós gyöngy alapú módszerhez képest (**4. ábra**).
- A három módszer pontossága között is nagy különbséget találtunk: a liofilizált gyöngyöket alkalmazó módszer nagyon jól visszaadta fehérvérsejt- és CD34+ számban is a célértéket. Míg a másik két módszer jelentősen alábecsülte mindkét értéket (**4. ábra**).
- Figyelembe véve a reprodukálhatóság és a pontosság értékeit, a liofilizált gyöngy alapú módszerrel nagyon pontosan lehet meghatározni a fehérvérsejt- és a CD34+ számot is. A szuszpenziós gyönggyel nem kaptunk kielégítő eredményt. A volumetriás módszer esetén egy szorzófaktor használatával elvileg jól becsülhető a célérték. Ennek bizonyítására sok mintán végeztük el a hematológiai automata vs áramlási citométer összehasonlítást (**5. ábra**). Minthogy a páronkénti összehasonlításból származó értékek hányadosa nagyon kis szórással volt megállapítható, így ezeket átlagolva és ezzel a szorzófaktorral korrigálva szintén jól becsülhető a célérték.

3,6	18,2	4,7	Precizitás (CV%)	5,1	16,8	3,8
19,3(-)	24,8(-)	3,7(+)	Célértéktől való eltérés (%)	21,4(-)	20,3(-)	3,9(-)
1,24	1,33	0,96	Elvi/mért hányados	1,27	1,25	1,04



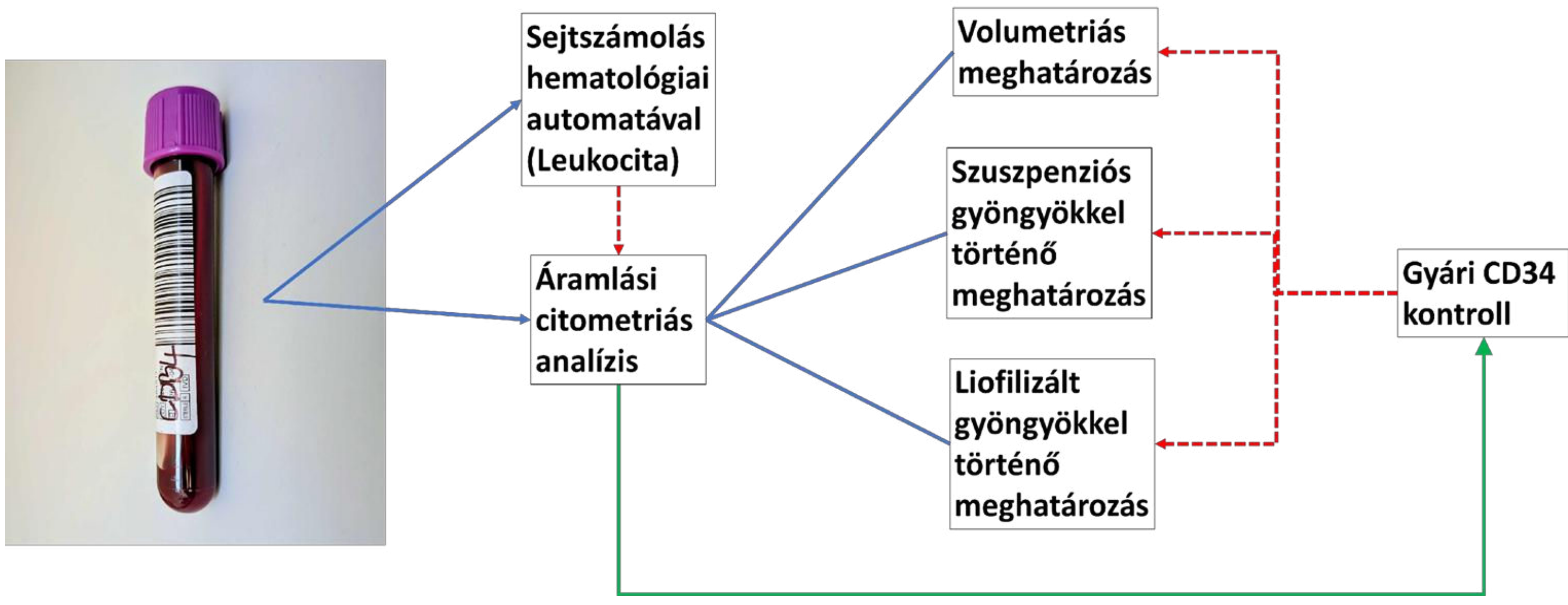
4. ábra. A különböző módszerekkel kalkulált WBC és CD34 sejtszámok alakulása a célértékhez képest. A bal oldali grafikonon a WBC koncentráció értékeit ábrázoltuk a hematológiai automatával meghatározott célértékhez (zöld, szaggatott vonal) képest. A jobb oldali grafikonon a CD34 koncentráció mérése látható. Itt a célértéket (zöld, szaggatott vonal) a gyári CD34 kontroll biztosította. Mindkét mérés esetén csak a liofilizált gyöngy alapú módszer nem tért el szignifikánsan a célértéktől. A precizitást és a célértéktől való pontos eltérést a grafikonok feletti táblázat mutatja. Ugyancsak ebben tüntettük fel a célértéktől való eltérést is az elvi/mért érték hányadosa formájában.

Diskusszió

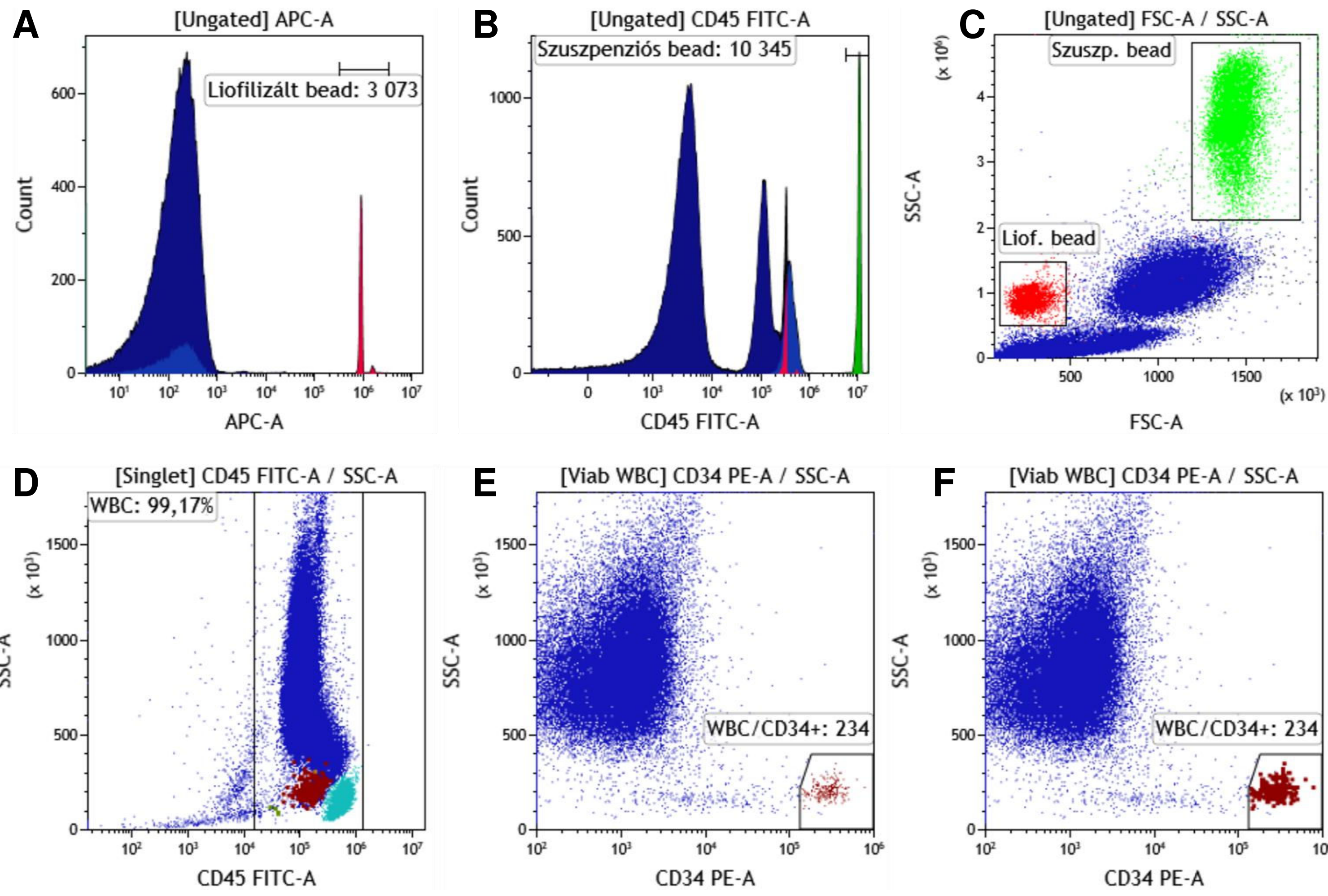
Az eredmények összehasonlítása után megállapítottuk, hogy a szuszpenziós gyöngy szórása, mind a célértéktől való eltérése a legnagyobb. Emiatt – legalább is a CD34 koncentráció meghatározásra – nem használható megbízhatóan. A liofilizált gyöngyalapú módszert találtuk a legpontosabbnak, hátránya azonban, hogy ez a legdrágább. A volumetriás módszer alacsony szórása miatt szintén jól alkalmazható, ha az áramlási citométeres mérésekhez megfelelő belső és külső kontrollt (pl. gyári CD34 kontrollt és hematológiai automatát) alkalmazunk, az eredményeket besorozzuk az általuk kapott korrekciós hányadossal, több párhuzamos mérést alkalmazunk és a mérés időbeli állandóságát ellenőrizzük (SSC/time dotplot). Így ha valamilyen tényező miatt nem áll rendelkezésünkre vagy nem használható a liofilizált gyöngy, akkor alternatív módszerként jól használható a volumetriás mérés is. Érdemes megjegyezni, hogy vizsgálataink csak a Beckman Coulter CytoFlex készülékével történtek, így annak eldöntésére, hogy az eredmények igazak-e más gyártmányú/típusú áramlási citométerre is, további vizsgálatokat szükséges végezni.

Anyagok és módszerek

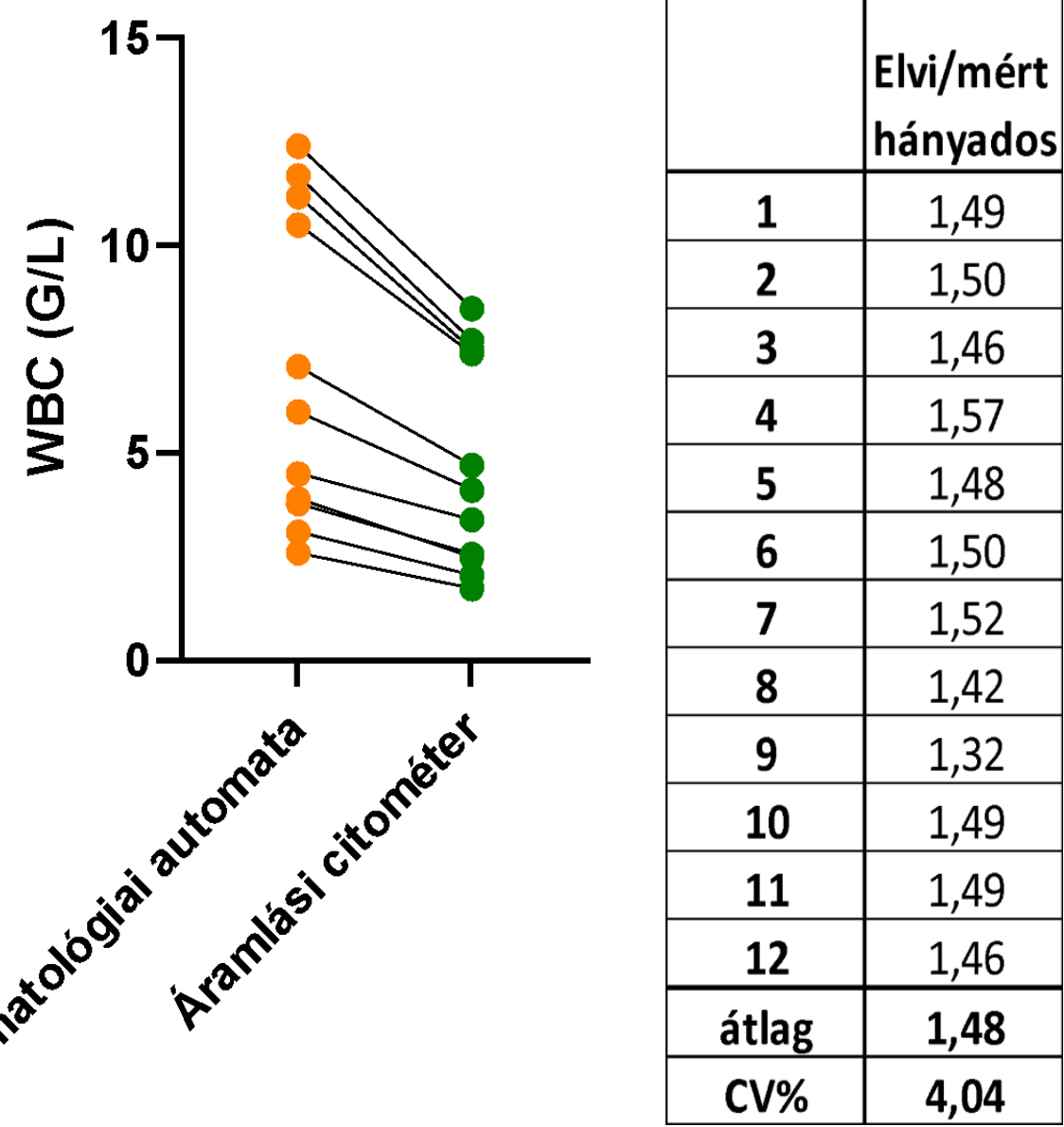
A fehérvérsejt (WBC)- és CD34+ abszolút sejtszámok meghatározását Beckman Coulter CytoFlex 6 csatornás áramlási citométerrel végeztük volumetriás módszerrel, illetve liofilizált és szuszpenziós gyöngyök segítségével (**2. ábra**). A célértékek meghatározását Sysmex KX-21N hematológiai automatával (WBC) és a Beckman Coulter által előre meghatározott számú CD34 kontroll (CD34+ sejtek) használatával végeztük. Az eredményeket 3x5 párhuzamos mérés alapján határoztuk meg. Az áramlási citometriás elemzésekhez Kaluza C szoftvert használtunk (**3. ábra**). A statisztikai elemzéseket GraphPad Prism 9 szoftverrel végeztük, egy mintás T-próba alkalmazásával, ahol a hipotetikus értékek a fent említett hematológiai automata WBC száma és a CD34 kontroll sejtszáma volt.



2. ábra. A WBC és CD34+ abszolút sejtszám meghatározásának folyamata áramlási citométerrel. A vérmintát háromféle áramlási citometriás módszerrel vizsgáltuk párhuzamosan, hogy megállapítsuk az abszolút fehérvérsejtszámot és az abszolút CD34 számot. Az összehasonlító méréshez szükséges célértékeket a hematológiai automatával (WBC szám) és a gyári CD34 kontrollal (CD34 szám) határoztuk meg.



3. ábra. Az analízis főbb lépései Kaluza C szoftverben. Az A panelen az APC hullámhosszán detektálható liofilizált gyöngyöket különítettük el, a B-n pedig a FITC hullámhosszán emittáló szuszpenziós gyöngyöket. A C-n a gyöngyöket is tartalmazó, vörösvértest mentesített vér FSC/SSC felhőképe látható. A fehérvérsejtekre való kapuzás után (D panel), a CD34^{high}/SSC^{low} helyzetű kapu mutatja meg a CD34+ őssejtek populációját (E panel). A jobb láthatóság kedvéért ezt a kis (0,23%-nyi) populációt az F panelen „rare events”-ként kiemelve láthatjuk.



5. ábra. A WBC sejtszámok összehasonlítása a hematológiai automata és az áramlási citométer volumetriás abszolútsejtszám kalkulációja alapján. 12 független betegmintában végeztünk párhuzamos összehasonlítást. A hematológiai automata és az áramlási citométer által kapott WBC koncentráció értékekből hányadost képeztünk, amelyet a táblázatban mutatunk be. A hányadosok átlaga, mint szorzófaktor, alkalmas a volumetriás mérésekből adódó sejtkoncentráció korrekciójára, minthogy az alacsony CV% megbízható becslést jelent.