

Bevezetés

A késői mintaszállítás és feldolgozás, mint preanalitikai hibák csökkenthetik a sejtek életképességét és megváltoztathatják az antigén expressziós mintázatukat. Ezáltal a leukémia-asszociált immunfenotípus (LAIP) mintázatuk is torzulhat, melynek felismerése különösen fontos a B-sejtes akut lymphoblastos leukémia (B-ALL) esetén, hiszen a későbbiekben ez alapján történik a minimális reziduális betegség (MRD) megítélése.

Célunk: megvizsgálni, hogyan változik az élő sejtek száma, a lymphoblastok és az érett B-sejtek aránya, valamint ezen sejtek immunfenotípusa.

Anyagok és módszerek

<u>Vizsgált időszak:</u>	2019. január-2021. december
<u>Betegek száma:</u>	n = 20 <i>de novo</i> ALL-es beteg (15 gyermek, 5 felnőtt)
<u>Minta újra jelölése:</u>	24, 48, 72 óra múlva
<u>Analizáló szoftver:</u>	BD FACS Diva™ Software 6.1.3 analizáló szoftver
<u>Statisztikai próbák:</u>	Friedmann teszt, Dunn post hoc teszt (GraphPad Prism 9.1.2)

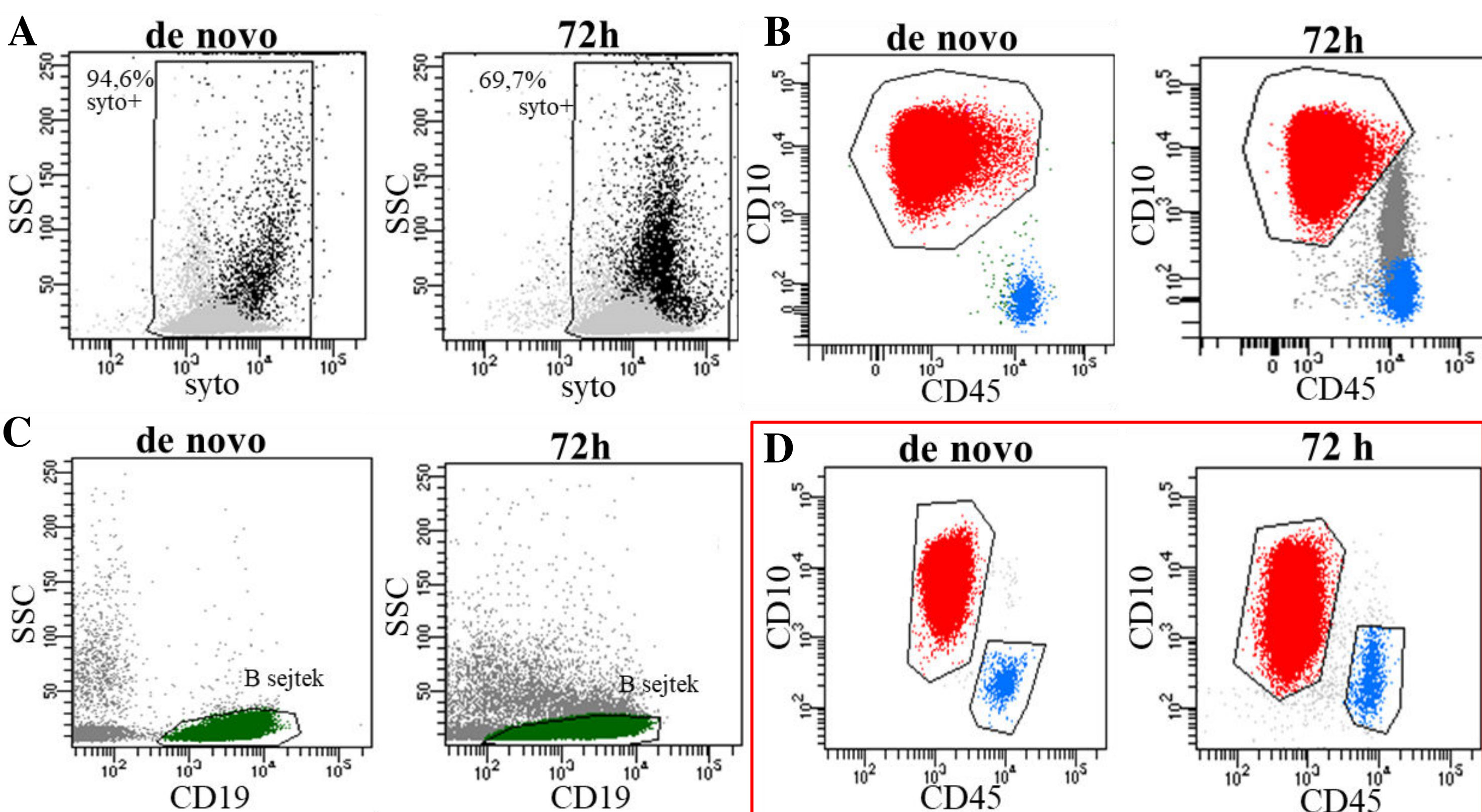
ALL-B *de novo* panel

	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PC7	APC	APC-H7	PB	PO
1.	syto	CD66c+CD123	CD34	CD19	CD10	CD38	CD20	CD45
2.	CD58	CD73+CD304	CD22	CD19	CD10	CD81	syto40	CD45
3.	nTdT	cyIgM	CD34	CD19	CD10	CD24	CD15	CD45
4.	cyFXIII	CD371	CD45	CD19	CD10	-	-	-

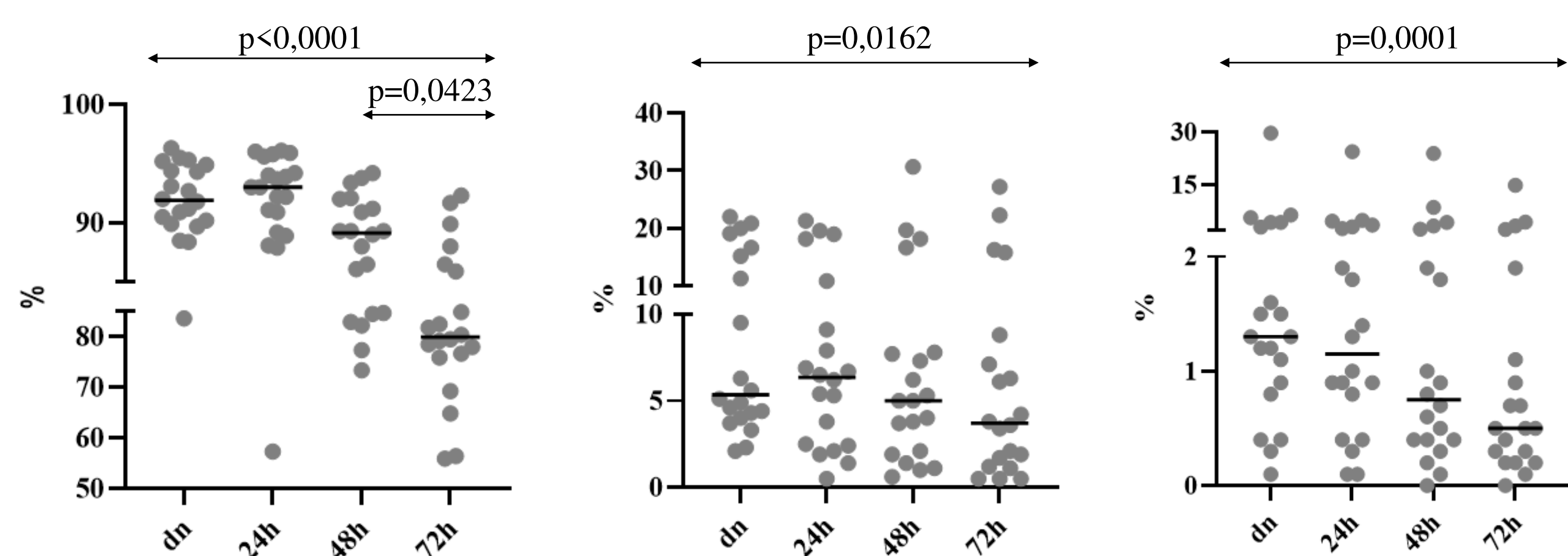
1. táblázat

Eredmények

A syto pozitív sejtek aránya 72 óra elteltével csökken, ezáltal a lymphoblastok aránya is szignifikánsan kevesebb lesz. A CD19 marker csökkenésével a B sejtek kapuzása 72 óra eltelte után bizonytalanabbá válik. A lymphoblastok CD10 expressziója inhomogénebbé válik.



1. ábra: A felszíni és intracitoplazmatikus csövekben bekövetkezett változások
A: syto+ élő sejtek. B: A felszíni csövekben CD10/CD45 dot ploton megkülönböztetett lymphoblastok (piros) és érett B-sejtek (kék). C: CD19+ B-sejtek (zöld). D: Lymphoblastok (piros) és érett B-sejtek (kék) az intracitoplazmatikus csövekben



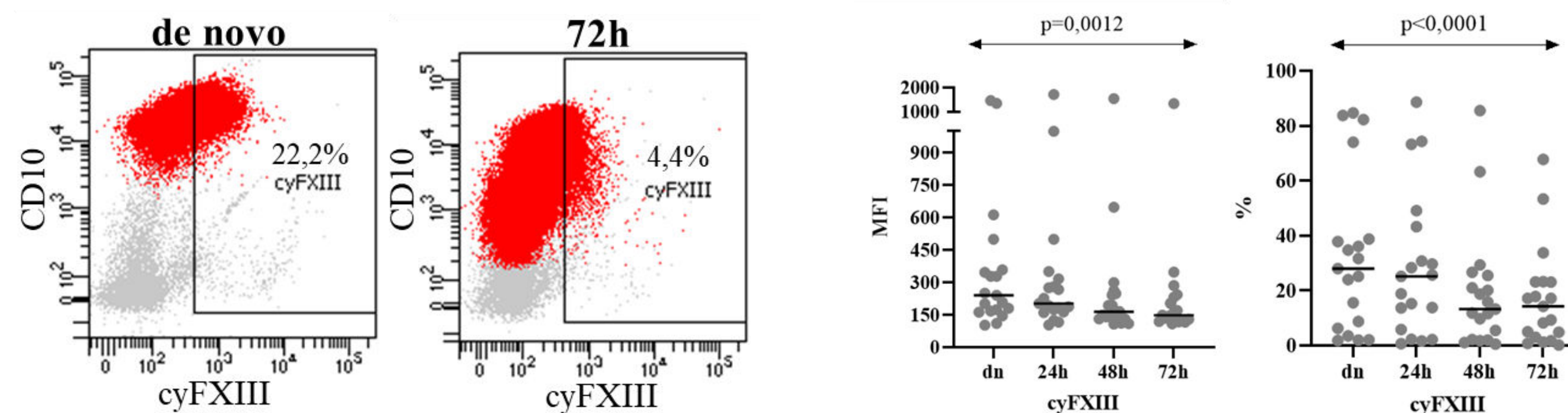
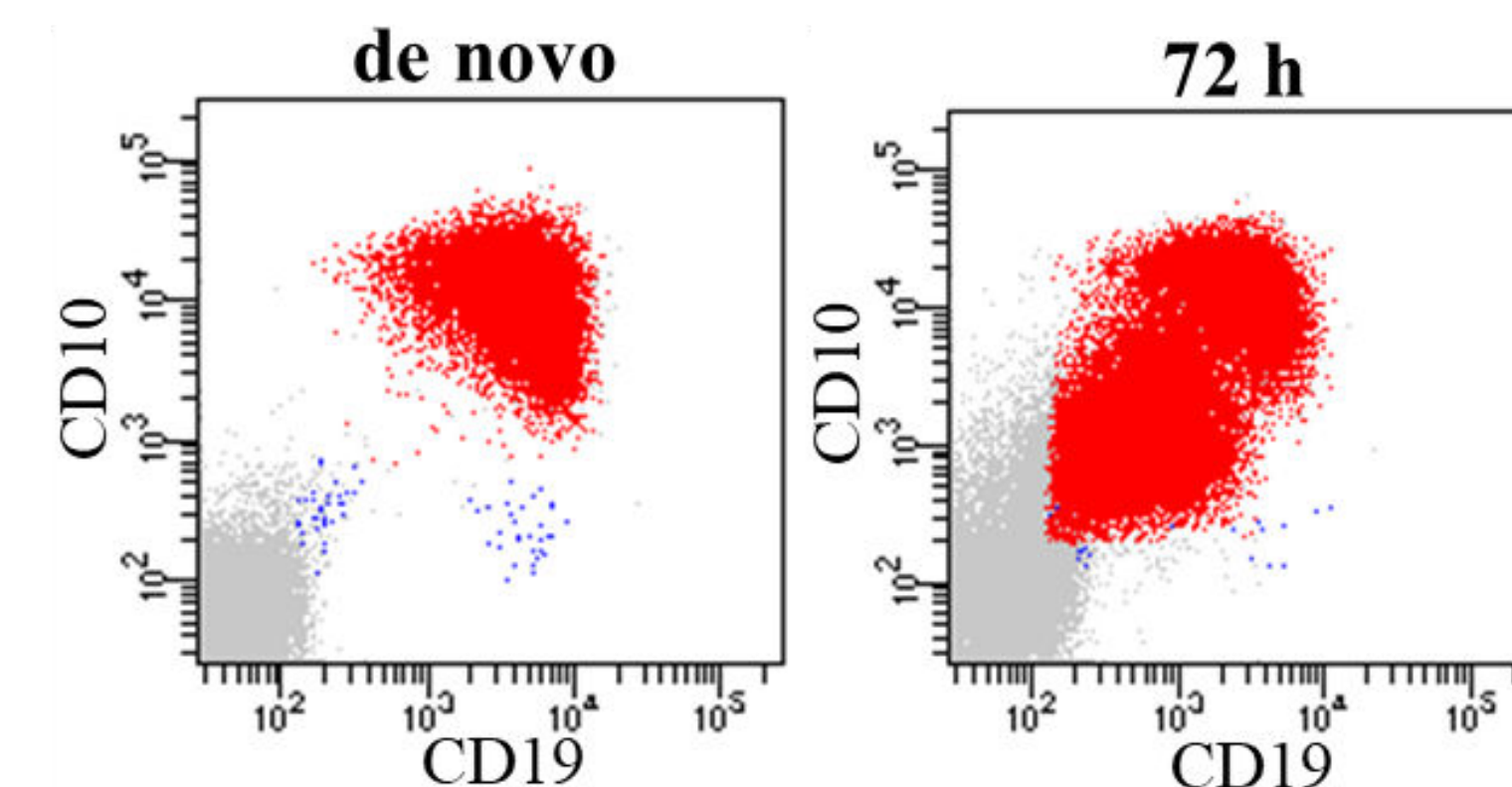
2. ábra: Sejtszám változások az 1. csőben:

A késői mintafeldolgozás hatására az élő sejteket jelölő, syto pozitív sejtek aránya, valamint a lymphoblastok és az érett B sejtek aránya is szignifikánsan csökkent.

	lymphoblast		érett B sejt	
	<i>csökkent</i>	<i>emelkedett</i>	<i>csökkent</i>	<i>emelkedett</i>
1. cső	CD19, CD10, CD38	CD20	CD19, CD38, CD20, CD45	
2. cső	CD58, CD73+CD304 CD19, CD10, CD81, CD45		CD73+CD304, CD19, CD45	
3. cső	cyFXIII-A%, cyFXIII-A			
4. cső	nTdT, CD34, CD19, CD10, CD45	CD24, CD15	CD19, CD45	CD34, CD15

2. táblázat: A lymphoblastok és az érett B sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitásának (MFI értékek) változása az egyes csövekben

3. ábra: Az intracitoplazmatikus cső esetében a mintafeldolgozásból adódóan a sejtek jobban pusztulnak. Ennek következtében 72 óra alatt az apoptotizáló sejtek 2 populációra válhatnak, melyek nem tekinthetők valós subklónnak.



4. ábra: A cyFXIII intenzitásának és százalékos értékének változása a 3. csőben

A cyFXIII-A esetében nemcsak a marker expressziójának intenzitása csökkent, hanem a százalékos értéke is, így a késői mintafeldolgozás esetén ezen prognosztikai markerről nem lehet megbízhatóan nyilatkozni.

Összefoglalás

- A preanalitikai faktorok közül a kései mintafeldolgozás jelentősen befolyásolja az immunfenotípus-eltérések számát és azok mértékét.
- A LAIP változása hatással van az MRD megítélésére.
- A 72 óra múlva intracitoplazmatikusan jelölt minták markánsabb eltérést mutatnak, így az intracitoplazmatikus markerek megítélése korlátozott.

Konklúzió

- Ha a leletet értékelő személy nem ismeri, hogy a késői mintafeldolgozás mely markerek expressziójának az intenzitását, milyen irányban és mértékben képes változtatni, akkor a LAIP-okról, prognosztikai markerekről téves interpretációt adhat.
- A végső diagnózist nem befolyásolja a késői mintafeldolgozás.

Irodalomjegyzék

- Kárai B, Miltényi Z, Gergely L, Száraz-Széles M, Kappelmayer J, Hevessy Z. The impact of delayed sample handling and type of anticoagulant on the interpretation of dysplastic signs detected by flow cytometry. *Biochem Med (Zagreb)*. 2018 Jun 15;28(2):020704. doi: 10.11613/BM.2018.020704.
- Navas A, Giraldo-Parra L, Prieto MD, Cabrera J, Gómez MA. Phenotypic and functional stability of leukocytes from human peripheral blood samples: considerations for the design of immunological studies. *BMC Immunol*. 2019 Jan 18;20(1):5. doi: 10.1186/s12865-019-0286-z
- Szánthó E, Kárai B, Ivády G, Baráth S, Száraz-Széles M, Kappelmayer J, Hevessy Z. Evaluation of Sample Quality As Preanalytical Error in Flow Cytometry Analysis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *eJIFCC*. 2019 Nov 25;30(4):385-395.