

IV. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ

ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΠΟΛΥΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

**Κώνστα Ευγενία, Χημικός, PhD
Επιστημονικός Συνεργάτης, Β' Παθολογική Προπαιδευτική Κλινική,
Αιματολογική Μονάδα, Π.Γ.Ν "Αττικών"**

Μέθοδοι Μέτρησης Απόλυτων Αριθμών

- Η συγκέντρωση του απόλυτου αριθμού των κυττάρων ορίζεται ως ο αριθμός των κυττάρων ενδιαφέροντος σε έναν γνωστό όγκο του δείγματος
- Οι κυτταρομετρητές ροής (λόγω σχεδιασμού τους) μπορούν εύκολα να μετρούν κύτταρα, αλλά καθώς δεν είναι εφικτή η άμεση ογκομετρική μέτρηση, θα πρέπει να εφαρμοστούν έμμεσοι μέθοδοι προκειμένου να προσδιοριστεί ο όγκος του εξεταζόμενου δείγματος
- **Μέθοδοι:**
 - ❖ Μέθοδοι δύο μηχανημάτων (dual platform - DP): βασίζονται σε μετρήσεις δύο μηχανημάτων (συνήθως ενός αιματολογικού αναλυτή και ενός κυτταρομετρητή ροής), που ωστόσο καταλήγει σε σφάλμα, που προκύπτει και από τις δύο μεθοδολογίες
 - ❖ Μέθοδοι ενός μηχανήματος (single platform - SP): βασίζονται στις μετρήσεις μόνο του κυτταρομετρητή ροής, αλλά απαιτείται ακριβές πιπετάρισμα του αίματος και των αντιδραστηρίων
- ✓ Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους, οι μέθοδοι ενός μηχανήματος είναι μεγαλύτερης ακρίβειας σε σχέση με αυτών των δύο μηχανημάτων διότι οδηγούν σε μείωση της διεργαστηριακής διακύμανσης

Μέθοδοι Δύο Μηχανημάτων

- Αρχικά, ο απόλυτος αριθμός των υποπληθυσμών των T-λεμφοκυττάρων εξαγόταν από τρεις μετρήσεις προσδιοριζόμενες από δύο μηχανήματα: 1. τον απόλυτο αριθμό των λευκοκυττάρων (WBC) και το ποσοστό των λευκοκυττάρων (WBC) που είναι λεμφοκύτταρα – προσδιοριζόμενα από τον αιματολογικό αναλυτή και 2. το ποσοστό των λεμφοκυττάρων που είναι CD4+ T-κύτταρα – προσδιοριζόμενο από τον κυτταρομετρητή ροής
- Αργότερα, αναπτύχθηκε η μεθοδολογία της «ΠανΛευκοοριοθέτησης» (“PanLeucogating”) όπου ο απόλυτος αριθμός των CD4+ T-κυττάρων προερχόταν από τον απόλυτο αριθμό των λευκοκυττάρων (WBC) και το ποσοστό των CD4+ T-κυττάρων εκφρασμένο ως μέρος των λευκοκυττάρων (WBC)
- ✓ Αυτή η μεθοδολογία μειώνει την διακύμανση αυτής της εξέτασης, αποφεύγοντας το ποσοστό των λεμφοκυττάρων όπως προσδιορίζονται από τον αιματολογικό αναλυτή, που είναι σχετικά ανακριβές
- Οι μέθοδοι δύο μηχανημάτων αντικαταστάθηκαν από τις μεθόδους ενός μηχανήματος εξαιτίας των ξεκάθαρων πλεονεκτημάτων των μεθόδων ενός μηχανήματος και της αυξανόμενης ανάγκης για ταυτόχρονη μέτρηση βιωσιμότητας

Μέθοδοι Ενός Μηχανήματος Βασιζόμενες στην Μέτρηση Όγκου

- Όσο τα λεμφοκύτταρα διαχωρίζονταν από τα λευκοκύτταρα (WBC) με βαθμιδωτή πυκνότητα και ακολουθούσε πλύσιμο πριν τον ανοσοφαινότυπο, τα αποτελέσματα των υποπληθυσμών των T-λεμφοκυττάρων αναφερόντουσαν ως ποσοστό των λεμφοκυττάρων
- Όταν η προετοιμασία του δείγματος για ανοσοφαινότυπο εξελίχθηκε στην άμεση χρήση δειγμάτων ολικού αίματος (μέθοδος: λύση, χρώση, όχι πλύσιμο), η απαίτηση για μέτρηση του απόλυτου αριθμού των CD4+ T-κυττάρων αυξήθηκε
- Η τροποποίηση των μηχανημάτων για κλινική χρήση ώστε να περιλαμβάνουν την μέτρηση όγκου του δείγματος έγινε με την προσθήκη ενός αντιδραστηρίου (απαίτηση πρόσθετου λογισμικού) ώστε να υπολογίζεται ο όγκος του αίματος χρησιμοποιώντας το ήδη υπάρχον περιρρέον υγρό: Τεχνολογία χρήσης των μικροφθοροσφαιριδίων για την παρακολούθηση της ταχύτητας της ροής κατά τη διάρκεια της ανάλυσης του ανοσοφαινοτύπου του δείγματος

Μέθοδοι Ενός Μηχανήματος Βασιζόμενες στην Μέτρηση Όγκου (2)

- Υπάρχουν δύο τύποι συστημάτων ενσωματωμένων στο υδροδυναμικό σύστημα διαθέσιμοι για τις μεθόδους ενός μηχανήματος που παρέχουν τον όγκο :
 1. Η κλασική μέθοδος αφορούσε ένα σύστημα με χρήση σύριγγας ακριβείας.
 2. Λιγότερο συχνό διπλά γραμμική συσκευή ανίχνευσης επιφάνειας επαφής αερίου-υγρού με σύστημα σύριγγας
- Σε κάθε περίπτωση, ένα λογισμικό αναλαμβάνει να κάνει τους απαραίτητους υπολογισμούς ώστε να εναρμονίσει τον πραγματικά μετρούμενο όγκο που παρατηρήθηκε στο οπτικό σύστημα και του όγκου του ολικού αίματος (μl)
- Θα πρέπει να σημειωθεί ότι:
 1. Δεν υπάρχουν ακόμα επαρκείς αποδείξεις που να υποστηρίζουν την αξιοπιστία αυτών των τεχνολογιών μέτρησης όγκου
 2. Δεν παρέχουν όλα τα μηχανήματα μέτρησης όγκου τρόπο αναφοράς, που απαιτείται για παιδιατρικούς ασθενείς που έχουν μολυνθεί με HIV (π.χ. αποτελέσματα υποπληθυσμών T-κυττάρων εκφρασμένα ως ποσοστό των λεμφοκυττάρων)

Μέθοδοι Ενός Μηχανήματος Βασιζόμενες στη Μέτρηση Σφαιριδίων

- Επιτρέπουν τον καθορισμό του απόλυτου αριθμού και του ποσοστού των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων ή τον απόλυτο αριθμό των CD34 χρησιμοποιώντας μόνο ένα σωληνάριο
- Βασίζονται στην προσθήκη ενός γνωστού αριθμού φθοριζόντων μικροσφαιριδίων σε γνωστό όγκο δείγματος, είτε χρησιμοποιώντας ένα σωληνάριο που περιέχει ίζημα με γνωστό αριθμό φθοριζόντων μικροσφαιριδίων, στην οποία προστίθεται το δείγμα είτε προσθέτοντας ένα διακριβωμένο εναιώρημα σφαιριδίων στο σωληνάριο τη στιγμή της ανάλυσης – Η πρώτη μέθοδος απαιτεί ένα μόνο βήμα πιπεταρίσματος ενώ η δεύτερη απαιτεί δύο
- Σε κάθε περίπτωση είναι απαραίτητο το ακριβές πιπετάρισμα του δείγματος και/ή των σφαιριδίων

Μέθοδοι Ενός Μηχανήματος Βασιζόμενες στην Μέτρηση Σφαιριδίων (2)

- Προκειμένου να αποφευχθεί η απώλεια των μετρούμενων σφαιριδίων είναι υποχρεωτική η προετοιμασία του δείγματος που περιλαμβάνει λύση-χωρίς πλύσιμο
- Η διαδικασία αυτή επιτρέπει στον κυτταρομετρητή ροής να μετρήσει τον όγκο του δείγματος που αναλύεται και στη συνέχεια να υπολογίσει τον απόλυτο αριθμό κάθε κυτταρικού στοιχείου σε σχέση με τη γνωστή συγκέντρωση των σφαιριδίων
- Η χρήση αυτών των αντιδραστηρίων μέτρησης του απόλυτου αριθμού στις μεθόδους ενός μηχανήματος μείωσε την διεργαστηριακή διακύμανση

Επικύρωση Διαδικασιών των Μεθόδων Ενός Μηχανημάτος

Μη Φυσιολογικές Τιμές Λεμφοκυττάρων

- Δείγματα με σημαντική λεμφοπενία μπορεί να μην διαθέτουν αρκετά λεμφοκύτταρα στο δείγμα ολικού αίματος για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής
- Αντίστροφα, κανονικές συγκεντρώσεις των αντισωμάτων μπορεί να είναι ανεπαρκείς να κορέσουν όλες τις θέσεις δέσμευσης σε δείγματα λεμφοκυτταρώσεων, οδηγώντας σε μη ακριβή ποσοτικοποίηση (π.χ. υποεκτίμηση)
- Τα συνηθέστερα διαθέσιμα αντισώματα για μέτρηση των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων θα αντιδράσουν κατάλληλα όταν η συγκέντρωση των λευκοκυττάρων (WBC) είναι μικρότερη από $20 \times 10^9 /L$, θεωρώντας ότι τα αντιδραστήρια έχουν τιτλοδοτηθεί ώστε να επιτυγχάνουν κορεσμό των αντιγόνων στόχων σε 1.000.000 κύτταρα στα 100 μL του δείγματος, όπως συμβαίνει συνήθως
- Το κάθε εργαστήριο θα πρέπει να έχει έναν τρόπο εκτίμησης της συγκέντρωσης των WBC στο δείγμα, είτε με άμεση μέτρηση είτε έχοντας πρόσβαση σε ταυτόχρονη μέτρηση της συγκέντρωσης των WBC του ιδίου ασθενούς από αιματολογικό αναλυτή
- Δείγματα με υψηλές συγκεντρώσεις WBC (π.χ. $> 20 \times 10^9 /L$) θα πρέπει να αραιώνονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε φυσιολογικό ορό (PBS) που περιέχει 1% αλβουμίνη ή άλλη πρωτεΐνη, ώστε η συγκέντρωση των WBC να είναι κατάλληλη για χρώση

Επικύρωση Διαδικασιών των Μεθόδων Ενός Μηχανήματος

Επαναλήψιμη και Ακριβής Τεχνική Πιπεταρίσματος (Pipetting)

- Η χρήση των μεθόδων ενός μηχανήματος για μέτρηση απόλυτων αριθμών απαιτεί επαναλήψιμη και ακριβή λήψη του αίματος και των μετρούμενων σφαιριδίων
- Η τεχνική της ανάστροφης αναρρόφησης (reverse pipetting technique) ενδείκνυται για την παροχή αυτών των εναιωρημάτων



Επικύρωση Διαδικασιών των Μεθόδων Ενός Μηχανήματος Επαναλήψιμη και Ακριβής Τεχνική Πιπεταρίσματος (Pipetting)

Επαλήθευση της Επαναληψιμότητας του Πιπεταρίσματος (Pipetting)

- Η επαναληψιμότητα του πιπεταρίσματος θα πρέπει να εκτιμάται περιοδικά (π.χ. μηνιαίως) για να εξασφαλιστεί η ακρίβεια των αποτελεσμάτων, καθώς και να διατηρούνται αρχεία αυτής της εκτίμησης για λόγους διασφάλισης ποιότητας
- 1. Χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανάστροφης αναρρόφησης να πιπεταριστούν δέκα δείγματα αίματος και να καταγραφούν τα βάρη – Να επιλεγεί ένας όγκος που συνήθως χρησιμοποιείται κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας.
- 2. Χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανάστροφης αναρρόφησης να πιπεταριστούν δέκα δείγματα εναιωρήματος των σφαιριδίων και να καταγραφούν τα βάρη (εφαρμογή σε μεθόδους όπου τα σφαιρίδια θα πρέπει να πιπεταριστούν μέσα στα σωληνάρια)
- 3. Να υπολογιστούν η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και ο συντελεστής μεταβλητότητας (coefficient of variation-CV) – Το CV για τα δέκα δείγματα θα πρέπει να είναι $< 2\%$

Επικύρωση Διαδικασιών των Μεθόδων Ενός Μηχανήματος Επαναλήψιμη και Ακριβής Τεχνική Πιπεταρίσματος (Pipetting)

Επαλήθευση της Ακρίβειας του Πιπεταρίσματος (Pipetting)

- Η ακόλουθη διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επαλήθευση της ακρίβειας του πιπεταρίσματος κατά τη μέτρηση του όγκου (παράδειγμα χρήσης πιπέτας των 100 μL και νερού - το βάρος 1 μL νερού αντιστοιχεί σε 1 μg)
- 1. Χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανάστροφης αναρρόφησης να πιπεταριστούν δέκα δείγματα απεσταγμένου νερού και να καταγραφούν τα βάρη (100 μL νερού ζυγίζουν 0,100 g)
- 2. Να υπολογιστούν η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και ο συντελεστής μεταβλητότητας (coefficient of variation-CV) – Το CV θα πρέπει να είναι < 2% (εύρος : 0,098-0,102)

Επικύρωση Διαδικασιών των Μεθόδων Ενός Μηχανήματος

Επαναλήψιμη και Ακριβής Τεχνική Πιπεταρίσματος (Pipetting)

Διαδικασία Πιπεταρίσματος (Pipetting)

1. Επιλογή επιθυμητού όγκου (κατά τη χρήση χειροκίνητων πιπετών, οι μεγαλύτεροι όγκοι θα πρέπει να οριστούν πρώτοι - εάν γίνεται η ρύθμιση από έναν χαμηλότερο σε έναν υψηλότερο όγκο, αρχικά πρέπει να ξεπεραστεί ο επιθυμητός όγκος και στη συνέχεια αργά να μειώνεται ο όγκος έως να φτάσει στον επιθυμητό) – Επιλογή κατάλληλου ρύγχους
2. Εάν μπορεί να εφαρμοστεί, γίνεται επιλογή του επιθυμητού τρόπου πιπεταρίσματος (π.χ. ανάστροφη αναρρόφηση) – Ενδεικνυόμενος τρόπος για βέλτιστη επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα
3. Ανάστροφη αναρρόφηση με χειροκίνητη πιπέτα:
Α) το κουμπί ελέγχου πιέζεται ελαφρώς μετά την πρώτη στάση καθώς γίνεται η αναρρόφηση → λήψη περισσότερου υγρού απ' ότι θα διατεθεί
Β) το κουμπί ελέγχου πιέζεται μόνο μέχρι την πρώτη στάση καθώς διαθέτει το υγρό → παραμονή μικρού όγκου στο ρύγχος μετά τη διανομή του υγρού

❖ Πληροφορίες από εγχειρίδια χρήσης από διάφορους κατασκευαστές πιπετών

Επικύρωση Διαδικασιών των Μεθόδων Ενός Μηχανήματος Επαναλήψιμη και Ακριβής Τεχνική Πιπεταρίσματος (Pipetting)

Διαδικασία Πιπεταρίσματος (Pipetting): Προξέπλυμα

➤ Διαδικασίες για βέλτιστη επαναληψιμότητα και ακρίβειας:

1. Όγκοι $\geq 10 \mu\text{L}$: Προξέπλυμα της πιπέτας 2 ή 3 φορές για κάθε νέο ρύγχος (δηλ. αναρρόφηση και παροχή του υγρού αρκετές φορές) ώστε:
 - Αντιστάθμιση της πίεσης του συστήματος, για μικρές διαφορές της θερμοκρασίας μεταξύ της πιπέτας και του υγρού, καθώς και για ιδιότητες του υγρού
 - Καθαρισμός του λεπτού φιλμ που δημιουργείται από το υγρό στο εσωτερικό της πιπέτας. Χωρίς προξέπλυμα, διατήρηση ενός λεπτού φιλμ

[Το πάχος και η φύση αυτού του φιλμ και επομένως η ενδεχόμενη πηγή λάθους ποικίλλει ανάλογα με τη φύση του υγρού που αναρροφάται]
2. Όγκοι $< 10 \mu\text{L}$: Όχι προξέπλυμα της πιπέτας, αλλά ξέπλυμα του ρύγχους μετά την παροχή υγρού για εξασφάλιση παροχής όλου του όγκου

Επικύρωση Διαδικασιών των Μεθόδων Ενός Μηχανήματος

Επαναλήψιμη και Ακριβής Τεχνική Πιπεταρίσματος (Pipetting)

Διαδικασία Πιπεταρίσματος (Pipetting): Γέμισμα

1. Προσκόλληση ρύγχους με ασφάλεια
2. Χρήση πιπέτας σε όρθια θέση (κάθετα)
3. Κατά την αναρρόφηση, παραμονή ρύγχους σε ένα σταθερό βάθος κάτω από την επιφάνεια του υγρού
4. Πίεση κουμπιού ελέγχου αργά και στρωτά (οι ηλεκτρονικές πιπέτες εκτελούν αυτό το βήμα αυτόματα)
5. Κατά το πιπετάρισμα κολλοειδών υγρών (π.χ. ολικό αίμα), παραμονή ρύγχους μέσα στο υγρό για ένα-δύο δευτερόλεπτα μετά την αναρρόφηση πριν την απομάκρυνσή του.
6. Μετά την αναρρόφηση του υγρού μέσα στο ρύγχος, όχι τοποθέτηση της πιπέτας στο πλάι

Επικύρωση Διαδικασιών των Μεθόδων Ενός Μηχανήματος

Επαναλήψιμη και Ακριβής Τεχνική Πιπεταρίσματος (Pipetting)

Διαδικασία Πιπεταρίσματος (Pipetting): Διανομή υγρού

1. Το ρύγχος θα πρέπει να είναι υπό γωνία, εάν είναι δυνατόν, έναντι του εσωτερικού τοιχώματος του δοχείου του σωληναρίου
2. Πίεση κουμπιού ελέγχου αργά και στρωτά (οι ηλεκτρονικές πιπέτες εκτελούν αυτό το βήμα αυτόματα)

Επικύρωση Διαδικασιών των Μεθόδων Ενός Μηχανήματος Επαναλήψιμη και Ακριβής Τεχνική Πιπεταρίσματος (Pipetting)

Άλλες Συστάσεις για Επαναλήψιμο και Ακριβές Πιπετάρισμα (Pipetting)

1. Για την εξασφάλιση βέλτιστης απόδοσης, η θερμοκρασία του υγρού, της πιπέτας και των ρυγχών θα πρέπει να είναι παρόμοια (λάθη στον όγκο μπορούν να συμβούν εξαιτίας των διακυμάνσεων της εκτόπισης του αέρα και του ιξώδους του υγρού) – **Όχι** πιπετάρισμα υγρών με θερμοκρασίες $> 70^{\circ}\text{C}$
2. Λάθη στον όγκο μπορεί επίσης να συμβούν με υγρά που έχουν υψηλή πίεση ατμών ή πυκνότητα/ιξώδες που διαφέρουν πολύ από εκείνη του νερού - Για τον συγκεκριμένο σκοπό, το νερό χρησιμοποιείται συνήθως για τη διακρίβωση των πιπετών και τον έλεγχο ανακρίβειας και μη επαναληψιμότητας
3. Συστηματικός έλεγχος των πιπετών για επαναληψιμότητα και ακρίβεια
4. Συστηματική συντήρηση (συμπεριλαμβανομένου και του καθαρισμού) είτε από τον χρήστη είτε από την τεχνική υπηρεσία, σύμφωνα με την οδηγίες του κατασκευαστή

Εφαρμογές της Κυτταρομετρίας Ροής

Αιματολογία

Ανοσολογία

Λοιμωξιολογία

Ογκολογία

Ουρολογία

Μαιευτική και Γυναικολογία

Στον τομέα των Μεταμοσχεύσεων

Παιδιατρική

Παθολογοανατομία

Κυτταρολογία

Πνευμονολογία

Νευρολογία

Οφθαλμολογία

Τυποποίηση Λευχαιμιών /Λεμφωμάτων
Μελέτη της πλοειδίας και των φάσεων του κυτταρικού κύκλου των Αιματολογικών κακοηθειών

Παρακολούθηση Μεταμοσχεύσεων

Παρακολούθηση θεραπειών

Αυτοάνοσα Νοσήματα

HLA-τυποποίηση

Διάγνωση PNH

Ποσοτικοποίηση των Αρχέγονων Αιμοποιητικών κυττάρων

Θετική διαλογή προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων

Μέτρηση των ΔΕΚ

Παρακολούθηση της Σήψης

Οξειδωτική έκρηξη - Φαγοκυττάρωση

Μελέτη του ανοσοφαινότυπου της Λευχαιμικής Υπολειμματικής Νόσου

Βασικός έλεγχος των HIV+ ατόμων

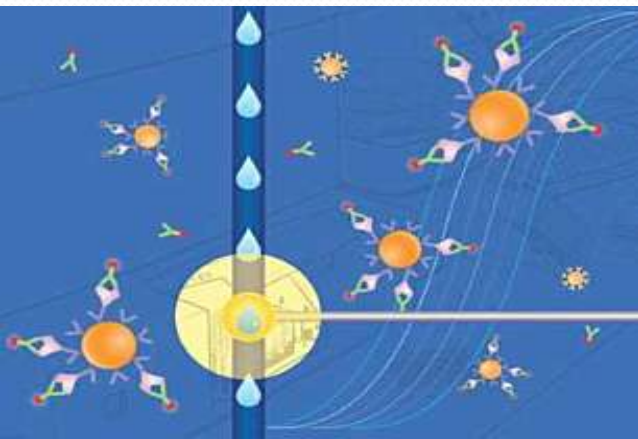
Ανοσολογικές Ανεπάρκειες

Μελέτη της ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων

DNA-Ανάλυση

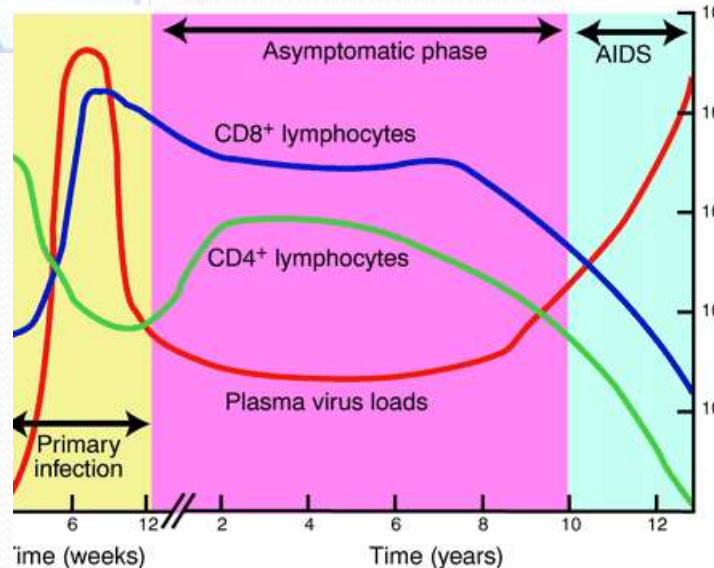
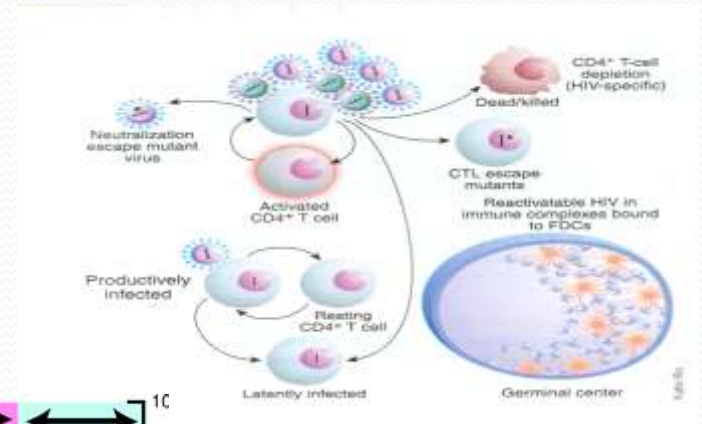
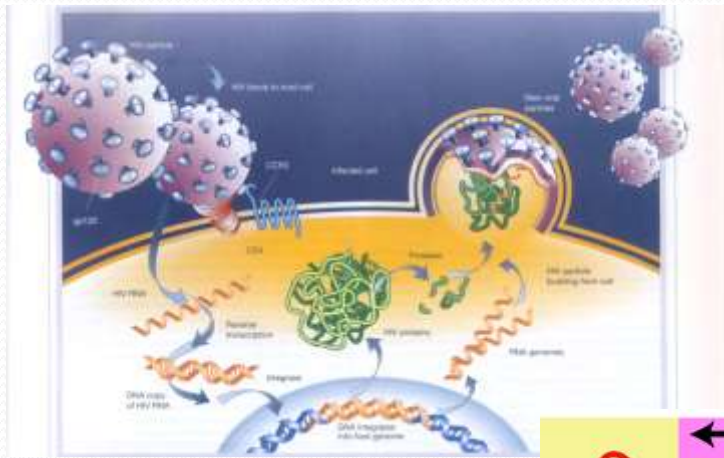
Μελέτη της αντοχής στα χημειοθεραπευτικά

Μελέτη της Απόπτωσης



Κλινικό και Ερευνητικό Επίπεδο

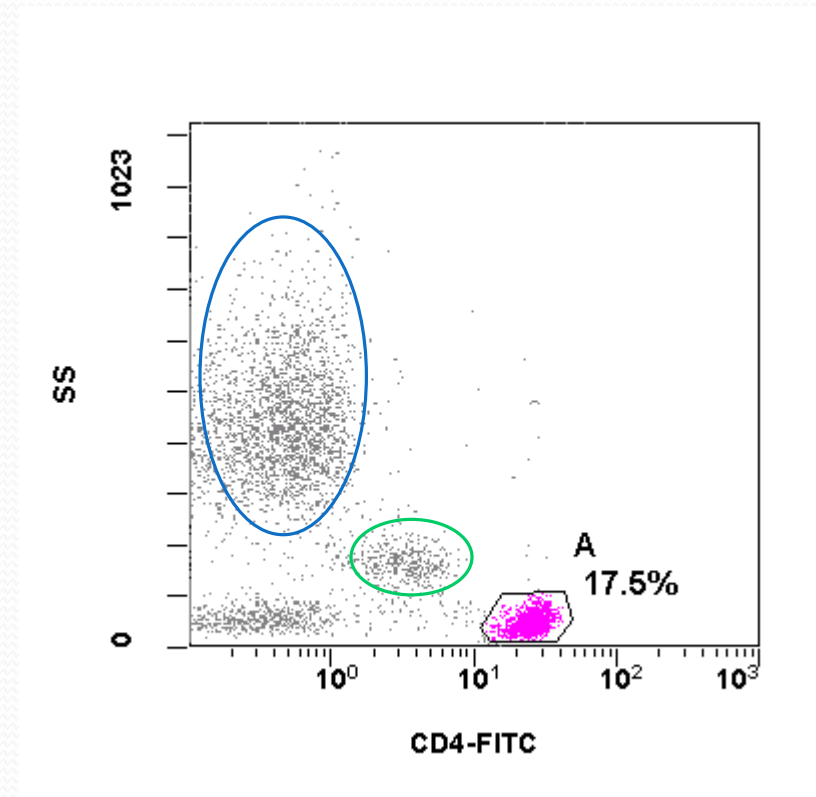
1. Μέτρηση απόλυτου αριθμού υποπληθυσμού CD4⁺ T λεμφοκυττάρων στην HIV λοίμωξη



1. Μέτρηση απόλυτου αριθμού υποπληθυσμού CD4+ T λεμφοκυττάρων στην HIV λοίμωξη (2)

➤ Δημιουργία πολλών συνδυασμών αντιδραστηρίων και ανοσοφαινοτυπικών πρωτοκόλλων για την μέτρηση απόλυτου αριθμού CD4+ T κυττάρων → επιλογή cost-effective πρωτοκόλλων (συνήθως αυτά με τα λιγότερα αντιδραστήρια):

1. Οριοθέτηση **CD4+ T λεμφοκυττάρων** μέσω στικτογράμματος $SS=f(CD4)$ και χρήση σφαιριδίων



1. Μέτρηση απόλυτου αριθμού υποπληθυσμού CD4+ T λεμφοκυττάρων στην HIV λοίμωξη (3)

2. Πρωτόκολλο “**PanLeucogating**” (σε μεθόδους με δύο μηχανήματα και με ένα μηχάνημα) όπου για την οριοθέτηση απαιτούνται δύο μονοκλωνικά αντισώματα (CD45 και CD4):
- A. Οριοθέτηση όλων των CD45+ WBC (PanLeucogate - gate A) βάση ενός στικτογράμματος $SS = f(CD45)$
- B. Οριοθέτηση όλων των CD4++ (bright) λεμφοκυττάρων με χαμηλό SS (gate B) βάση ενός στικτογράμματος $SS = f(CD4)$

Υπολογισμός απόλυτου αριθμού CD4+ T κυττάρων = $\frac{\text{αριθμός δεδομένων events gate B}}{\text{αριθμός δεδομένων events gate C}} \times \text{αριθμός WBC} (\times 10^9/L)$

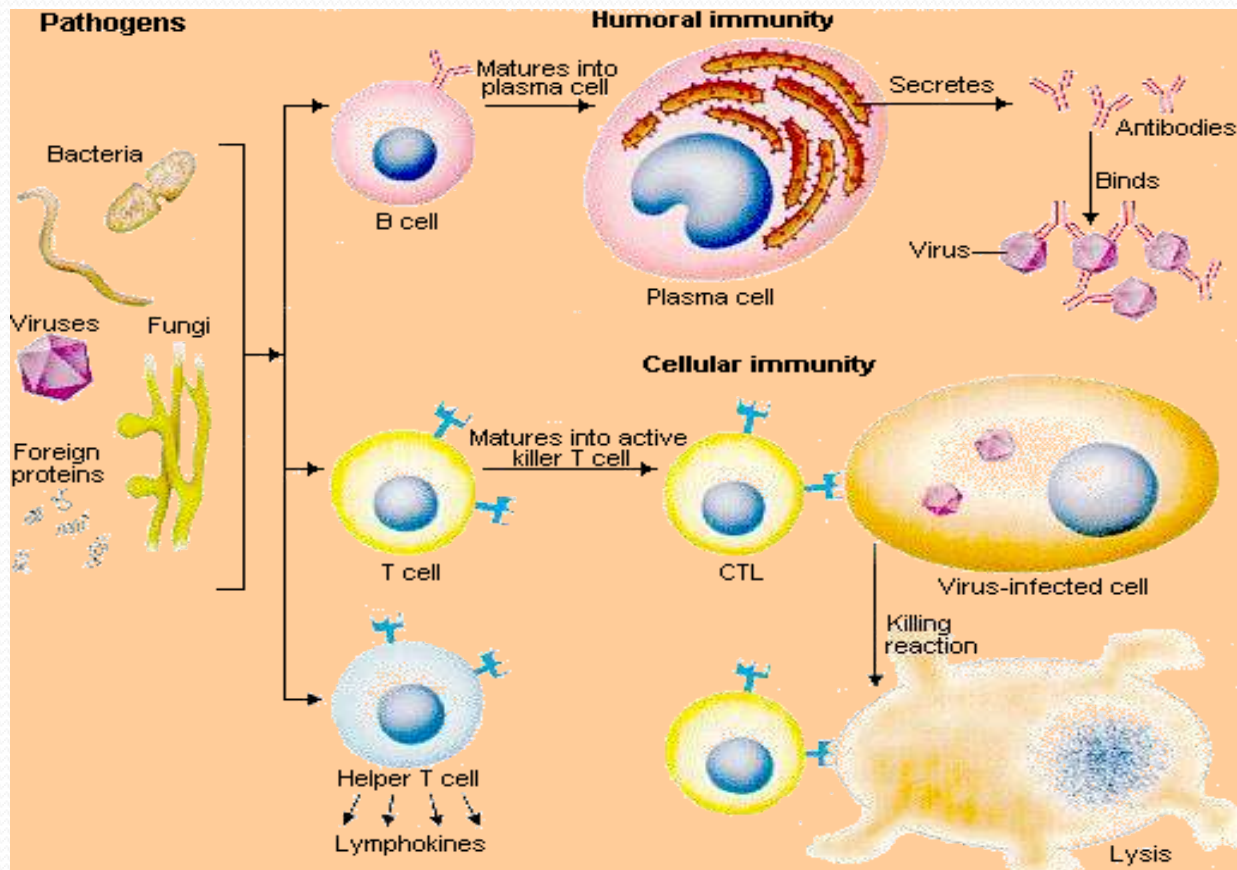
όπου όλα τα δεδομένα παρέχονται από τον κυτταρομετρητή ροής, εκτός του αριθμού των WBC από αιματολογικό αναλυτή – αποκλεισμός του καθορισμού του απόλυτου αριθμού των λεμφοκυττάρων από αιματολογικό αναλυτή – μείωση της υπάρχουσας διακύμανσης των αποτελεσμάτων μίας μεθόδου δύο μηχανημάτων

1. Μέτρηση απόλυτου αριθμού υποπληθυσμού CD4+ T λεμφοκυττάρων στην HIV λοίμωξη (4)

3. Πρωτόκολλο “**T-gating**” όπου για την οριοθέτηση απαιτούνται τρία μονοκλωνικά αντισώματα (CD3, CD4 και CD8):
- A. Οριοθέτηση όλων των T-κυττάρων βάση ενός στικτογράμματος $SS = f(CD3)$ – όπου είναι δυνατή και η διάκριση των CD4 T κυττάρων, μονοκυττάρων, κοκκιοκυττάρων και B κυττάρων
- B. Ακολουθεί η μελέτη όλων των CD3+ T-κυττάρων βάση δύο παραμέτρων: CD4 και CD8
- Μέτρηση του απόλυτου αριθμού των υποπληθυσμών των T-κυττάρων, χρησιμοποιώντας δύο φθορίζουσες ουσίες σε δύο σωληνάρια (CD3/CD4 και CD3/CD8) (εσωτερικός έλεγχος των τιμών των CD3), ενώ το κάθε σωληνάριο περιέχει μία προκαθορισμένη ποσότητα μετρούμεων μικροσφαιριδίων

2. Μέτρηση απόλυτου αριθμού υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων

➤ Προσδιορισμός T, B, NK, NKT κυττάρων



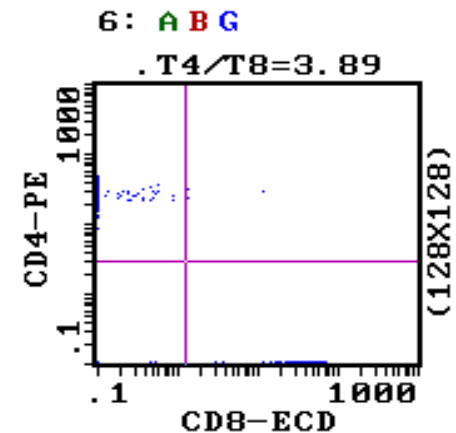
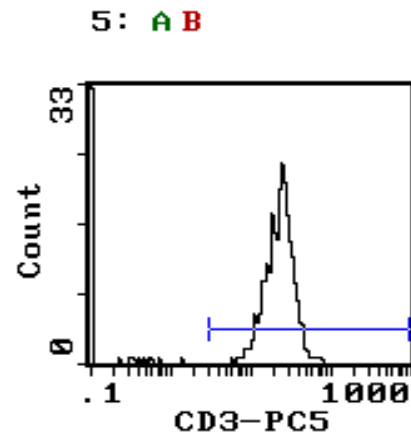
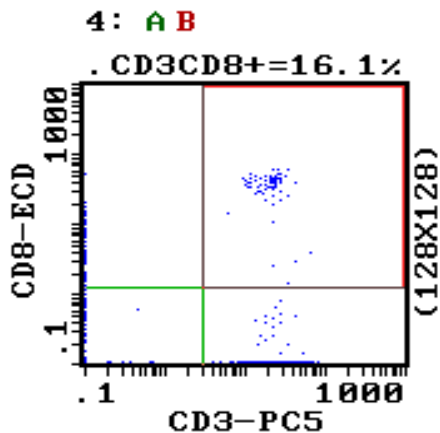
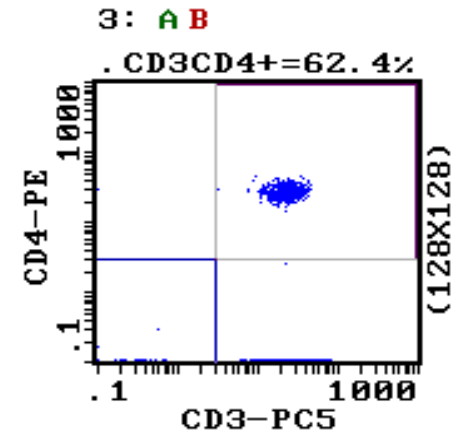
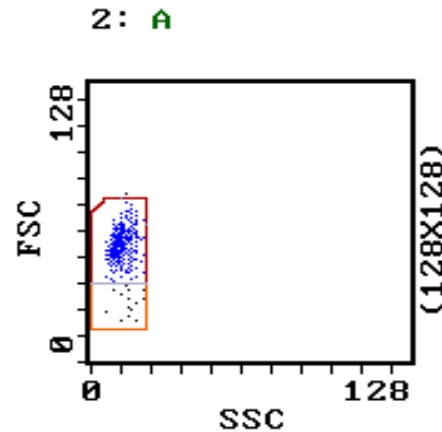
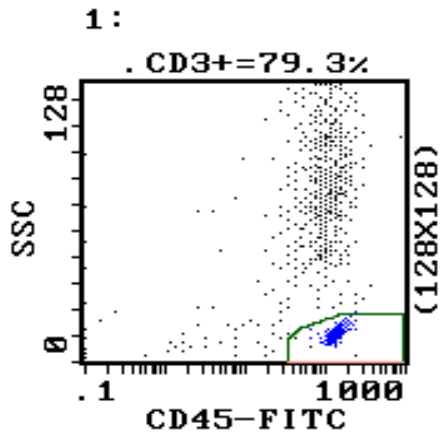
2. Μέτρηση απόλυτου αριθμού υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων (2)

Σωληνάριο	Αντισώματα	Σκοπός μίγματος
1	CD19/CD5/CD45	Οριοθέτηση σε CD45++/SS, μέτρηση συνολικών B, T και NK λεμφοκυττάρων
2	CD3/CD4/CD45	Οριοθέτηση σε CD45++/SS, μέτρηση CD3+CD4+ T λεμφοκυττάρων
3	CD3/CD8/CD45	Οριοθέτηση σε CD45++/SS, μέτρηση CD3+CD8+ T λεμφοκυττάρων
4	CD3/CD16+56/CD45	Οριοθέτηση σε CD45++/SS, μέτρηση CD3-/CD16+and/orCD56+ (NK κύτταρα) και CD3+/CD16+and/orCD56+ (NK-T λεμφοκυττάρων)

2. Μέτρηση απόλυτου αριθμού υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων (3)

Σωληνάρι ο	Αντισώματα	Σκοπός μίγματος
1	CD3/CD19/CD56/CD45	Οριοθέτηση σε CD45++/SS, μέτρηση συνολικών T, B, NK λεμφοκυττάρων
2	CD3/CD4/CD8/CD45	Οριοθέτηση σε CD45++/SS, μέτρηση CD3+/CD4+ και CD3+/CD8+T λεμφοκυττάρων

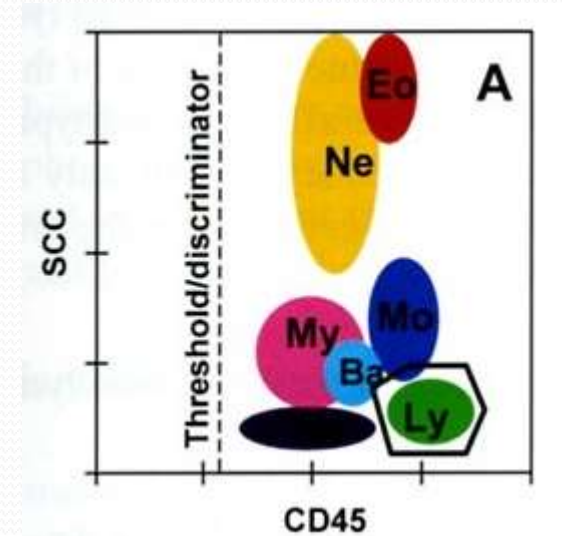
2. Μέτρηση απόλυτου αριθμού υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων (4)



2. Μέτρηση απόλυτου αριθμού υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

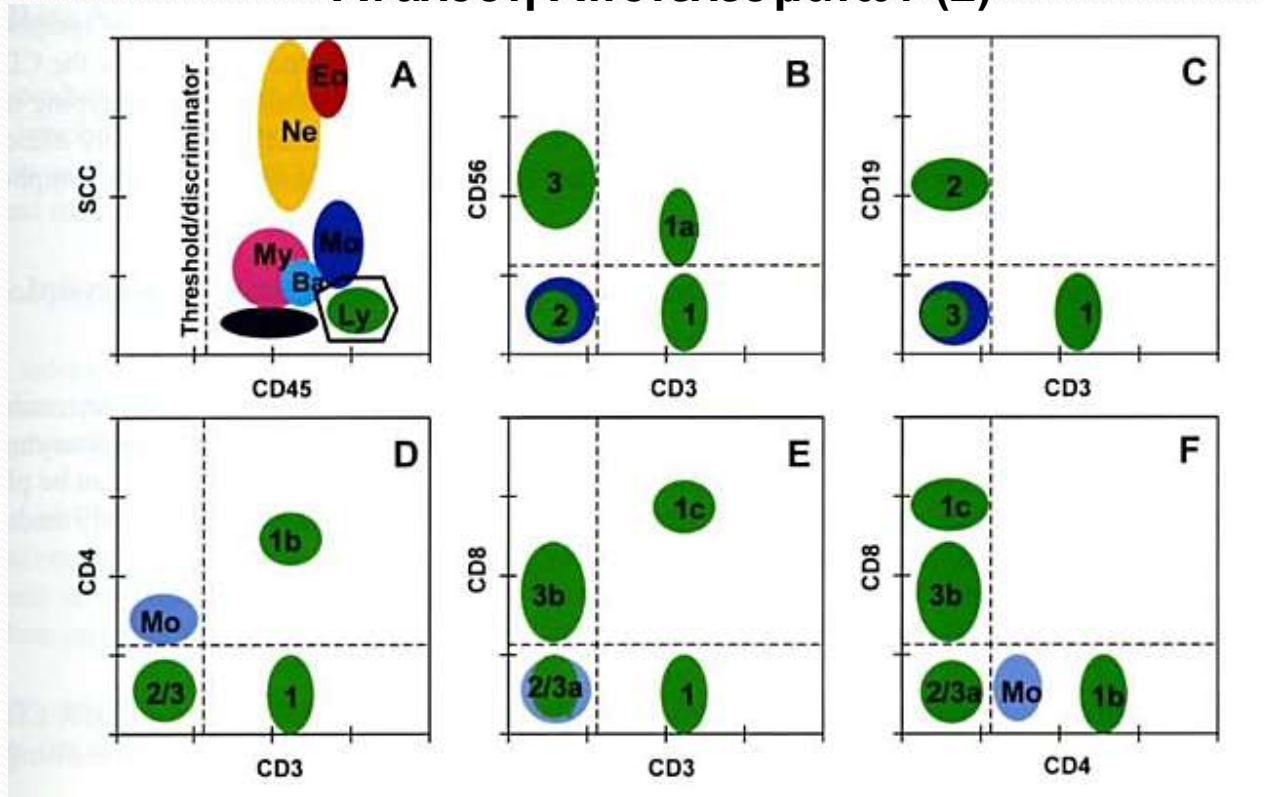
- Οριοθέτηση **όλων** των λεμφοκυττάρων βάση ενός στικτογράμματος SS= f (CD45) : bright CD45 expression / χαμηλό SS
- **Μονοκύτταρα** (χαμηλότερη CD45 expression / ενδιάμεσο SS) και **Βασεόφιλα** (χαμηλότερη CD45 expression / χαμηλό SS) θα πρέπει να αποκλειστούν



- Έκφραση CD45 ελαφρώς μικρότερη στα B λεμφοκύτταρα σε σχέση με τα T λεμφοκύτταρα (ο μεγαλύτερος υποπληθυσμός των λεμφοκυττάρων)
- NK λεμφοκύτταρα: όμοια ένταση της έκφρασης του CD45 σε σχέση με τα T λεμφοκύτταρα, αλλά ελαφρώς υψηλότερο SS

2. Μέτρηση απόλυτου αριθμού υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων

Ανάλυση Αποτελεσμάτων (2)



- Οριοθέτηση του 95% των λεμφοκυττάρων βάση ενός στικτογράμματος $SS=f(CD45)$
- Η ύπαρξη ενός μικρού ποσοστού μονοκυττάρων δεν θα επηρεάσει τον καθορισμό των CD3 T υποπληθυσμών, παρά μόνο όταν οι υποπληθυσμοί των T-λεμφοκυττάρων εκφράζονται ως ποσοστό κυττάρων επί των λεμφοκυττάρων

2. Μέτρηση απόλυτου αριθμού υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων

Ανάλυση Αποτελεσμάτων (3)

- ❖ Έλεγχος αναλυτικής αξιοπιστίας στις Μεθόδους Ενός Μηχανήματος μέσω επαλήθευσης της ακρίβειας του απόλυτου αριθμού:
- ✓ Χρήση της παραμέτρου “acquisition time” για καθορισμό του χρόνου απόκτησης του αριθμού των μετρούμενων σφαιριδίων που αντιπροσωπεύει έναν καθορισμένο όγκο του αναλυόμενου δείγματος
- ✓ Κατά τη διάρκεια της απόκτησης δεδομένων, εφαρμογή και ενεργοποίηση της παραμέτρου «χρόνος»
- ✓ Εάν το πιπετάρισμα του αίματος πραγματοποιήθηκε μη εμφανώς λανθασμένα και τα μετρούμενα σφαιρίδια προστέθηκαν στα σωληνάρια με ακρίβεια, ο απαιτούμενος χρόνος για την ανάλυση ενός προκαθορισμένου αριθμού μετρούμενων σφαιριδίων θα πρέπει να είναι σταθερός
- ✓ Εάν ο απαιτούμενος χρόνος για να συγκεντρωθεί αυτός ο αριθμός ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των δειγμάτων, θα πρέπει να υπάρχει ένα σοβαρό πρόβλημα κατά την προετοιμασία των δειγμάτων και η επεξεργασία του δείγματος θα πρέπει να επαναληφθεί

2. Μέτρηση απόλυτου αριθμού υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων

Ανάλυση Αποτελεσμάτων (4)

- Στις περισσότερες περιπτώσεις: $(CD3+CD4+)\% + (CD3+CD8+)\% = CD3+\% \pm 5\%$, με μία μέγιστη διακύμανση $\pm 10\%$
- Σε δείγματα που περιέχουν έναν αξιόλογο αριθμό ασυνήθιστων υποπληθυσμών T λεμφοκυττάρων:
 - TCRγδ+ T λεμφοκύτταρα
 - CD3+CD4-CD8- T λεμφοκύτταρα
 - CD3+CD4+CD8dim T λεμφοκύτταρα

Αυτός ο έλεγχος της αξιοπιστίας θα πρέπει να ξεπερνάει τα παραπάνω όρια

2. Μέτρηση απόλυτου αριθμού υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων

Ανάλυση των Μετρούμενων Σφαιριδίων

- Στις **Μεθόδους ενός Μηχανήματος** για την μέτρηση των απόλυτων αριθμών ενός συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού (συγκέντρωση ανά μονάδα όγκου) από μία μόνο μέτρηση του κυτταρομετρητή:
 1. Μία ακριβής μέτρηση του όγκου του δείγματος πιπιετάρεται μέσα σε ένα σωληνάριο και προστίθεται η ίδια ακριβής μέτρηση του όγκου των μετρούμενων σφαιριδίων
 2. Χρήση εμπορικά διαθέσιμων σωληναρίων που περιέχουν λυοφιλοποιημένο ίζημα με γνωστό αριθμό μετρούμενων σφαιριδίων
- Κατά την ανάλυση των δεδομένων, είτε μονά σφαιρίδια θα πρέπει να συμπεριληφθούν στην ανάλυση είτε όλα τα σφαιρίδια (μονά και συσσωρεύσεις) συμπεριλαμβάνονται στον αριθμό των σφαιριδίων, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή

2. Μέτρηση απόλυτου αριθμού υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων

Αναφορά των αποτελεσμάτων

- Οι απόλυτοι αριθμοί και τα ποσοστά αναφέρονται για κάθε πληθυσμό των λεμφοκυττάρων (π.χ. T, B και NK κύτταρα) και για τους T-υποπληθυσμούς (π.χ. CD3+CD4+ και CD3+CD8+)

*** Τα ποσοστά είναι ιδιαίτερα σημαντικά στην παρακολούθηση παιδιατρικών ασθενών

- Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να παραχθούν απευθείας από το λογισμικό χρησιμοποιώντας είτε μία μέθοδο ενός ή δύο μηχανημάτων
- Κατά τη χρήση μιας μεθόδου δύο μηχανημάτων, απαραίτητη η λήψη μιας μέτρησης με ακρίβεια των WBC: μέτρηση σε ένα δείγμα όμοιο με αυτό για ανάλυση ανοσοφαινοτύπου και προσδιορισμού μέσα σε 6 ώρες
 - *Most current edition of CLSI/NCCLS document H20-Reference Leukocyte [WBC] Differential Count [Proportional] and Evaluation of Instrumental Methods*
- Χρήση μιας μεθόδου ενός μηχανήματος όταν δεν είναι διαθέσιμη μία μέτρηση με ακρίβεια των WBC γιατί οι απόλυτοι αριθμοί των λεμφοκυττάρων δεν μπορούν να αναφερθούν χρησιμοποιώντας μία μέθοδο δύο μηχανημάτων

2. Μέτρηση απόλυτου αριθμού υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων

Αναφορά των αποτελεσμάτων (2)

- **Στις μεθόδους δύο μηχανημάτων**, χρήση WBC και όχι απόλυτου αριθμού των λεμφοκυττάρων για τον υπολογισμό των απόλυτων αριθμών των T-κυτταρικών υποπληθυσμών – WBC: ένας πολύ πιο σταθερός παρονομαστής από ότι ο απόλυτος αριθμός των λεμφοκυττάρων (μεγαλύτερη μεταβλητότητα μεταξύ των αιματολογικών αναλυτών)
- **Στις μεθόδους ενός μηχανήματος**, οι απόλυτοι αριθμοί προέρχονται απευθείας από τα δεδομένα του κυτταρομετρητή και μπορούν να παραχθούν απευθείας από σχετικό λογισμικό
- Όσον αφορά χειροκίνητη επεξεργασία δεδομένων, χρήση ακόλουθου τύπου για υπολογισμό του απόλυτου αριθμού των λεμφοκυττάρων:

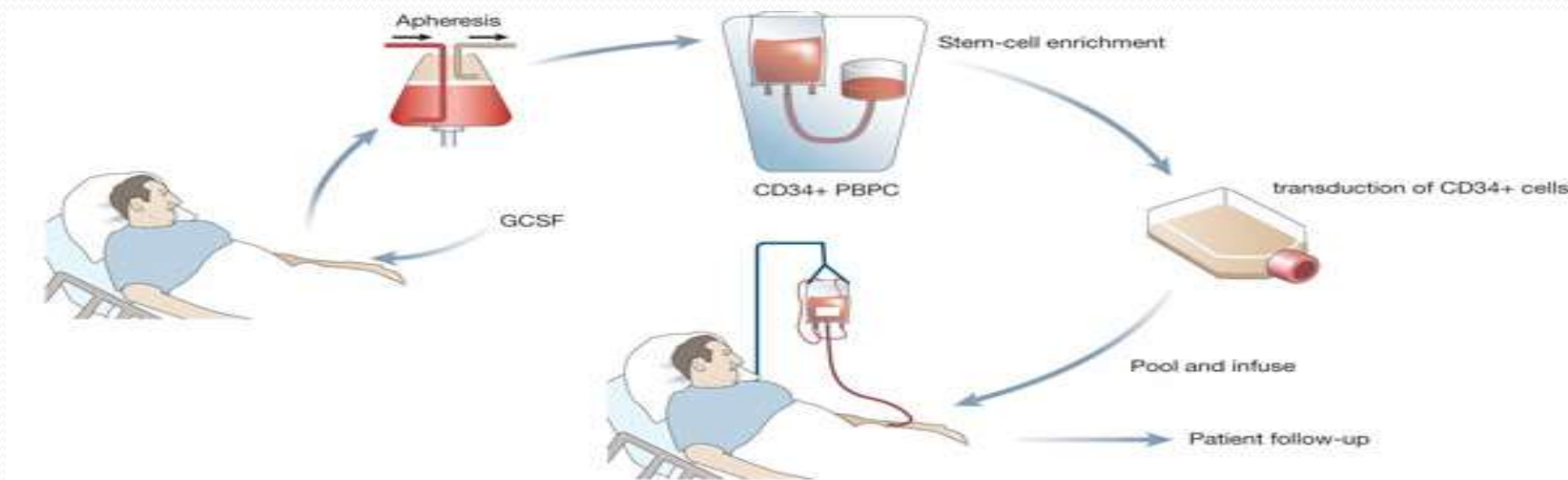
Αριθμός δεδομένων στην περιοχή bright CD45
Αριθμός δεδομένων στην περιοχή μικροσφαιριδίων

X

Συνολικός αριθμός των προστιθέμενων μικροσφαιριδίων
Όγκος του προστιθέμενου αίματος

3. Μέτρηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων CD34+

- ❑ Οι μεταμοσχεύσεις περιφερικών προγονικών / αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων του περιφερικού αίματος αποτελούν πλέον θεραπευτική επιλογή για αρκετές κακοήθειες. Το αιμοποιητικό σύστημα του ασθενούς ή του δότη διεγείρεται προς παραγωγή πολυδύναμων αρχέγονων κυττάρων (stem cells), τα οποία εγκαταλείπουν το μυελό των οστών και κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα



❖ **Πρωτόκολλο ISHAGE** (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering) μετατράπηκε σε μέθοδο ενός μηχανήματος και εξάγει τη μέγιστη διαθέσιμη πληροφορία από τις παραμέτρους:

- Χαρακτηριστικά σκέδασης και μεγέθους (FSC, SSC)
- Έκφραση CD34 (αρχέγονα και προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα)
- Έκφραση έντασης intensity CD45 (παν-λευκοκυτταρικός δείκτης)
- Έκφραση 7- ακτινομυκίνης D (7-AAD) (δείκτης βιωσιμότητας κυττάρων)

3. Μέτρηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων CD34+ (2)

- Συνδυασμός των παραμέτρων με στρατηγική διαδοχικών Boolean οριοθετήσεων και δυνατότητα εφαρμογής σε:
 - ✓ αίμα
 - ✓ προϊόντα λευκαφαίρεσης
 - ✓ καθαρά εναιωρήματα CD34⁺ κυττάρων
 - ✓ αίμα ομφαλίου λώρου
 - ✓ δείγματα μυελού των οστών
- Ταυτόχρονη χρώση μονοκλωνικών CD34 και CD45:
 - A) αποκλεισμό των θραυσμάτων (debris) και των δεδομένων με μη ειδική χρώση από την ανάλυση
 - B) δημιουργία ενός αξιόπιστου παρονομαστή (WBC) απ' όπου είναι δυνατή η μέτρηση των CD34⁺ κυττάρων
 - Γ) διάκριση των μη κακοήθων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (έκφραση σχετικά χαμηλών επιπέδων CD45 στην επιφάνειά τους) από τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα (έκφραση σε υψηλά επίπεδα) και ταυτοποίησή τους βάση της έκφρασης CD45/ SSC (όπως των λεμφοκυττάρων, μονοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων)
- Απαραίτητη η χρήση της ανάστροφης αναρρόφησης του δείγματος και των μετρούμενων σφαιριδίων

3. Μέτρηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων CD34+

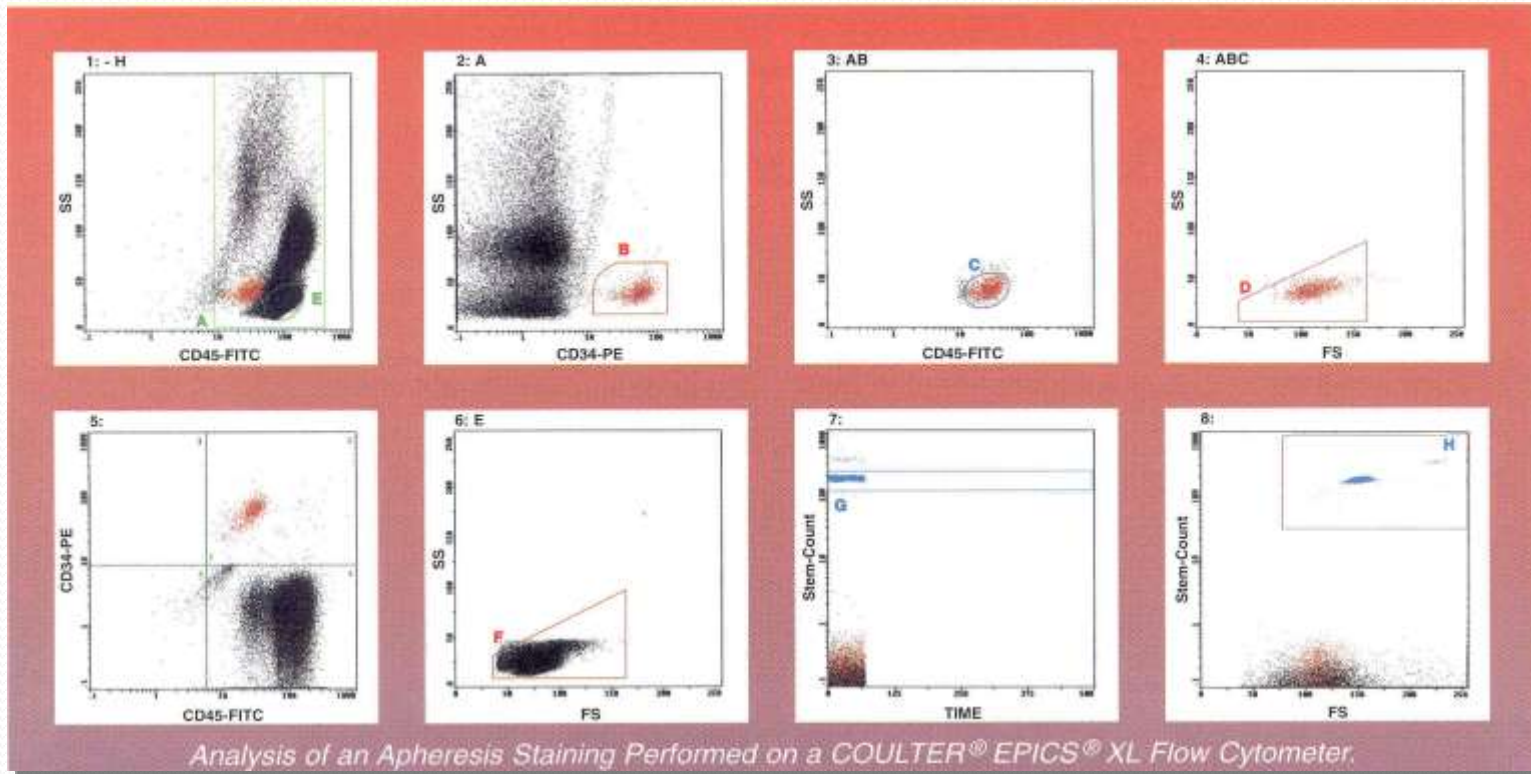
Επίδραση της φύλαξης του δείγματος

- ❖ *Ο αριθμός των CD34+ κυττάρων επηρεάζεται από ποικιλία παραγόντων:*
 - ο Άμεση επεξεργασία του δείγματος
 - ο Απαραίτητη η χρήση της 7-AAD για τον αποκλεισμό των νεκρών κυττάρων από την μέτρηση των CD34+ κυττάρων (εύκολος ο συνδυασμός της με τις φθορίζουσες ουσίες FITC και PE) - κυρίως στις περιπτώσεις:
 - ✓ δειγμάτων μυελού των οστών
 - ✓ αίμα ομφαλίου λώρου
 - ✓ προϊόντων λευκαφαίρεσης άνω των 4 ωρών
 - ✓ δειγμάτων που έχουν υποστεί επεξεργασία με κάθε τρόπο

3. Μέτρηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων CD34+ (3)

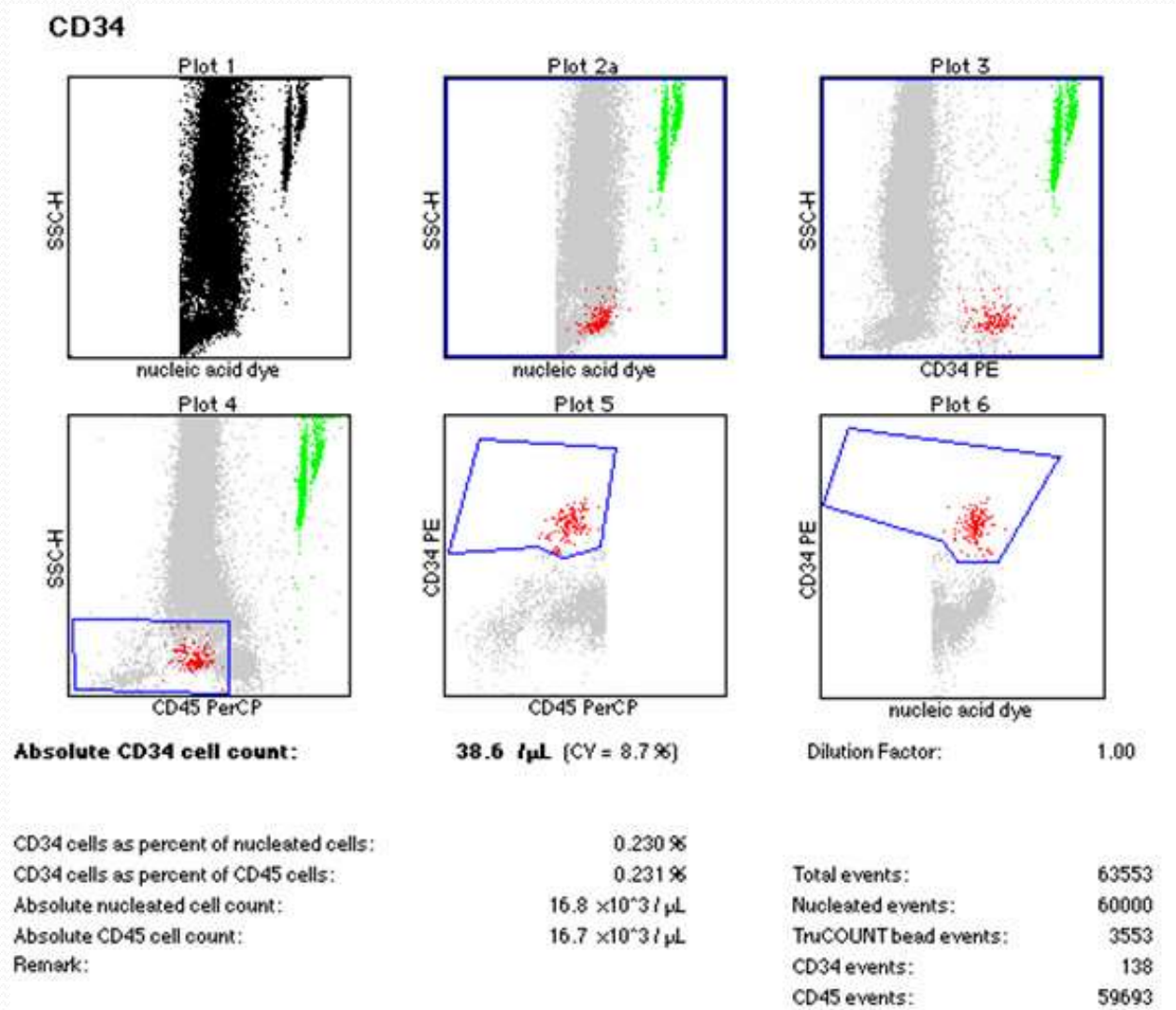
- ❑ Απαιτείται μέτρηση 75 000 κυττάρων ή 100 αρχέγονων/προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (stem cells)
- ❑ Εάν το λογισμικό δεν υπολογίζει απευθείας τον απόλυτο αριθμό των CD34⁺ κυττάρων, τότε χρησιμοποιείται η ακόλουθη σχέση:
$$\text{CD34}^+ \text{ κύτταρα/}\mu\text{L} = \frac{\text{αριθμός CD34}^+ \text{ κυττάρων (περιοχή D)} \times \text{B} \times \text{DF}}{\text{αριθμός beads (περιοχή G)}}$$

* DF : ο παράγοντας αραίωσης του δείγματος και B : η συγκέντρωση σφαιριδίων / * Τελικό αποτέλεσμα: ο μέσος όρος των δύο σωληναρίων

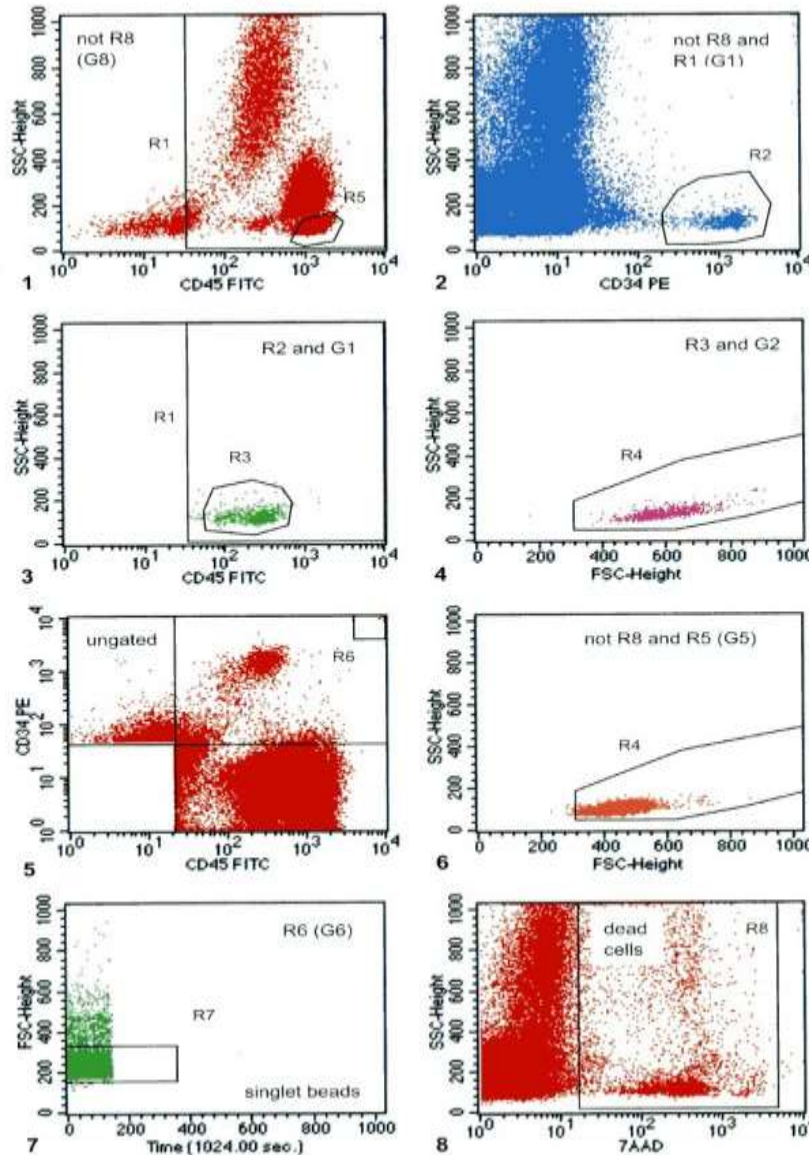


- ❑ Ιδιαίτερη προσοχή στην περίπτωση δειγμάτων με απόλυτο αριθμό CD34⁺ στην περιοχή D < 100, καθώς η επαναληψιμότητα της μεθόδου μειώνεται εξαιτίας του χαμηλού μετρούμενου αριθμού κυττάρων

3. Μέτρηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων CD34+ (4)



3. Μέτρηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων CD34+ (5)



File: PBSC040401.005
Gate: G1
Total Events: 82132

Gate	Events	% Gated
G1	70762	100.00
G2	733	1.04
G3	713	1.01
G4	711	1.00
G5	17342	24.51
G6	5476	7.74
G7	4800	6.78
G8	70762	100.00
G9	65286	92.26

**Stored PBSC
(24 hr old)**

**Abs viable
CD34+ cells**

= $\frac{G4}{G7} \times \text{bead conc}$

= $\frac{711}{4800} \times 998$

= 146/ μl

3. Μέτρηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων CD34+ (6)

- ❑ Χρήση αυτού του πρωτοκόλλου και στην περίπτωση εμπορικά διαθέσιμων σωληναρίων απόλυτου αριθμού αντί για χρήση μικροσφαιριδίων – Υπολογισμός των απόλυτων αριθμών των κυττάρων σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή
- ❑ Όταν τα μετρούμενα σφαιρίδια είναι πολύ μικρά → **όχι** δημιουργία ουδό (threshold) στο FSC, αλλά σε μία παράμετρο φθορισμού
- ❑ Πλεονέκτημα χρήσης τοποθετημένων εκ των προτέρων σφαιριδίων: μείωση απαίτησης προσεκτικής εναιώρησης και πιπτεταρίσματος των μετρούμενων σφαιριδίων – Απαραίτητο το σωστό πιπτετάρισμα σε περιπτώσεις:
 - ✓ προαραίωσης του δείγματος (εάν απαιτείται)
 - ✓ μεταφοράς του δείγματος μέσα στο σωληνάριο
- ❖ Ορισμένοι τύποι δείγματος (π.χ. αίμα ή αίμα ομφαλίου λώρου) κατά την προετοιμασία τους με μία διαδικασία λύσης/χωρίς πλύσιμο μπορεί να περιέχουν ένα πολύ μεγάλο ποσοστό θραυσμάτων – Δημιουργώντας μία οριοθέτηση για τον αποκλεισμό των CD34⁻CD45⁻ στο 5^ο ιστόγραμμα πριν την απόκτηση των δεδομένων → αποκλεισμός μεγάλου ποσοστού των θραυσμάτων από το αρχείο list-mode

3. Μέτρηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων CD34+

Αναφορά των Δεδομένων

- Αναφορά όλων των δεδομένων ως απόλυτοι αριθμοί των ζώντων CD34+ κυττάρων
- Απαραίτητη η αναφορά της βιωσιμότητας του ολικού δείγματος → γενική εκτίμηση της ποιότητας του δείγματος [ιδιαίτερα σε περιπτώσεις δειγμάτων αίματος ομφαλίου λώρου και κάθε άλλου δείγματος που έχει αποθηκευτεί πέραν των 4 ωρών]
- Επανελέγχος των προϊόντων λευκαφαίρεσης που έχουν αποθηκευτεί κατά τη διάρκεια της νύκτας, ώστε εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους άμεσα πριν την κρυοκατάψυξη
- Στην περίπτωση προϊόντων λευκαφαίρεσης και δειγμάτων αίματος ομφαλίου λώρου, ο υπολογισμός του απόλυτου αριθμού των CD34+ κυττάρων γίνεται ανά κιλό του βάρους του ασθενούς → εκτίμηση από τον θεράπων ιατρό εάν τα συλλεχθέντα CD34+ κύτταρα είναι αρκετά για μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων
- ❖ Απαραίτητες πληροφορίες:
 - ✓ ο απόλυτος αριθμός CD34+ κυττάρων
 - ✓ ο όγκος του ασκού του προϊόντος της λευκαφαίρεσης ή δείγματος αίματος ομφαλίου λώρου
 - ✓ το βάρος του ασθενούς

3. Μέτρηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων CD34+

Ερμηνεία των Δεδομένων και Όρια Αναφοράς

- Σε πολλά εργαστήρια το εύρος 5-10 CD34+ κύτταρα/ μL ουδό (threshold) κάτω του οποίου: **όχι** υποβολή του ασθενούς στη διαδικασία της λευκαφαίρεσης
- Εάν η συγκέντρωση των WBC $< 0.7 \times 10^9$ κύτταρα/ μL : ίσως ακατάλληλη η εκτέλεση της διαδικασίας της λευκαφαίρεσης, εφόσον σε τόσο χαμηλά επίπεδα αίματος ο ακριβής καθορισμός της στοιβάδας των μονοπυρήνων αποτελεί πρόβλημα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της λευκαφαίρεσης
- Στην περίπτωση προϊόντων λευκαφαίρεσης, έκφραση εύρους-στόχου των CD34+ κυττάρων ανά κιλό του βάρους του ασθενούς - συνήθως $2-5 \times 10^6$ CD34+ κύτταρα/kg για μία μόνο διαδικασία μεταμόσχευσης



Σας Ευχαριστώ!