

# **Πειράματα σπάνιων γεγονότων και ανεπαρκών δεδομένων**

Μαριάννα Τζανουδάκη

Τμήμα Ανοσολογίας & Ιστοσυμβατότητας Γ.Ν.Παιδων Αθηνών «Η Αγία Σοφία»

**Μικρή ποσότητα δείγματος  
(ανεπαρκή δεδομένα)**

# Μικρή ποσότητα δείγματος

```
graph TD; A[Μικρή ποσότητα δείγματος] --> B[Χαμηλή κυτταροβρίθεια]; A --> C[Μικρός όγκος];
```

**Χαμηλή κυτταροβρίθεια**

ΕΝΥ (Εγκεφαλονωτιαίο υγρό)

Απλαστικός/  
υποπλαστικός μυελός  
των οστών

**Μικρός όγκος**

Παιδιατρικά δείγματα

Βιοψία λεπτής βελόνης (FNA, Fine Needle Aspiration)

# Λύση του προβλήματος

Χαμηλή κυτταροβρίθεια



Φυγοκέντρηση του  
δείγματος-  
Απόχυση υπερκειμένου



Μικρός όγκος



- Σταδιακή μελέτη
- Πολυχρωματική κυτταρομετρία ροής
- Χρήση δύο διαφορετικών MoAbs με το ίδιο φθοριόχρωμα (μελέτη περισσότερων παραμέτρων /σωληνάριο)
- Μείωση του όγκου δείγματος /σωληνάριο

# Παράδειγμα σταδιακής μελέτης: ENY

1/3 δείγματος γενικό πρωτόκολλο



Αποτέλεσμα

+

Περαιτέρω έλεγχος  
με  
εξειδικευμένο πρωτόκολλο

-

Επανάληψη  
γενικού πρωτοκόλλου  
στα 2/3 του δείγματος  
(2πλάσια κύτταρα)

# Χρήση δύο διαφορετικών MoAbs στο ίδιο φθοριόχρωμα

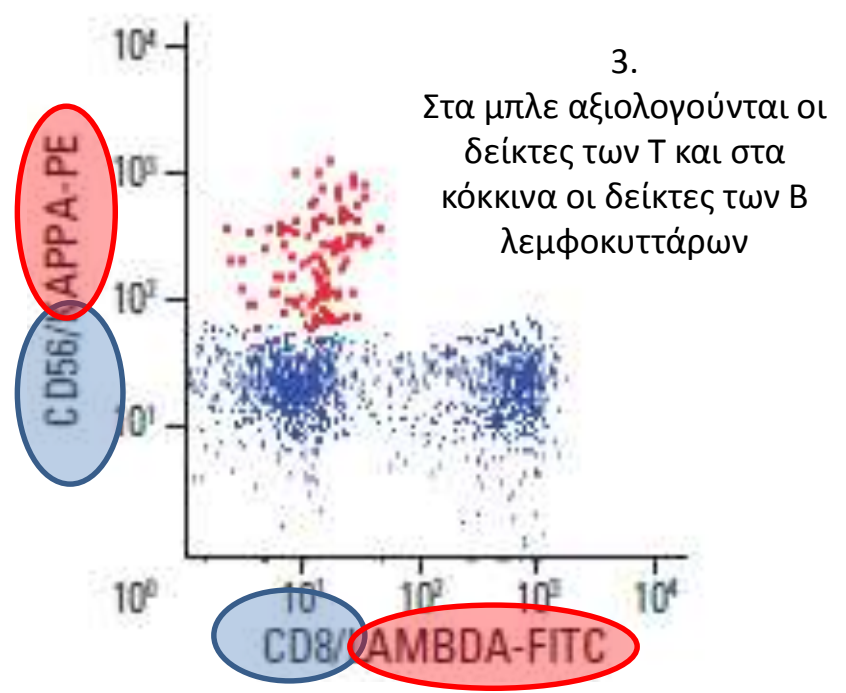
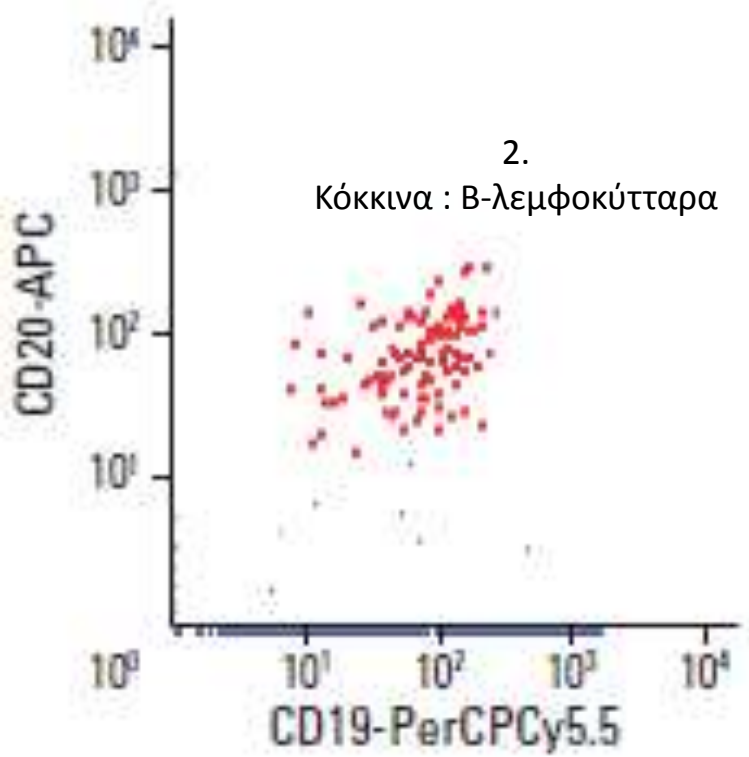
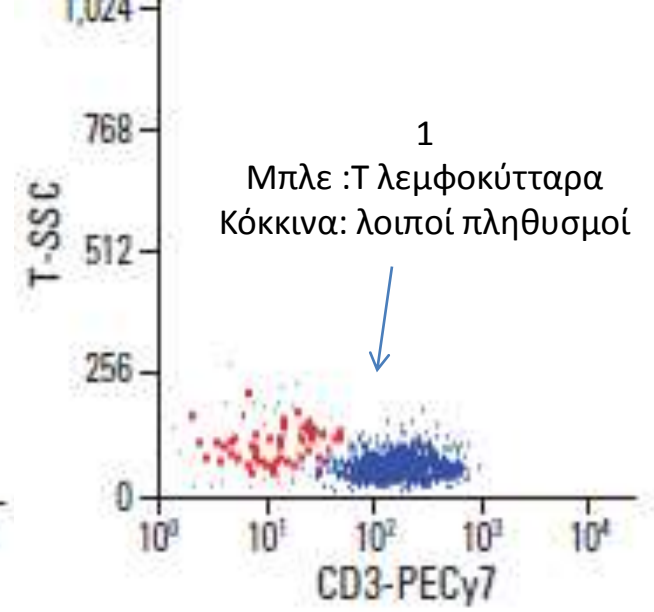
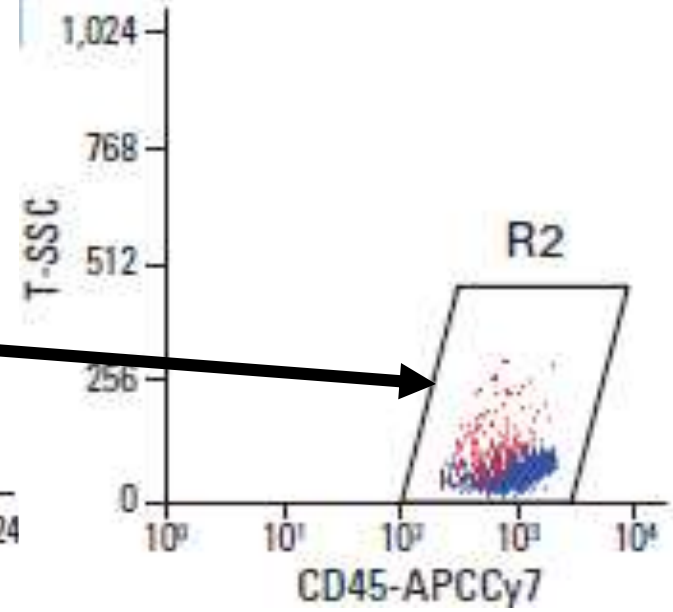
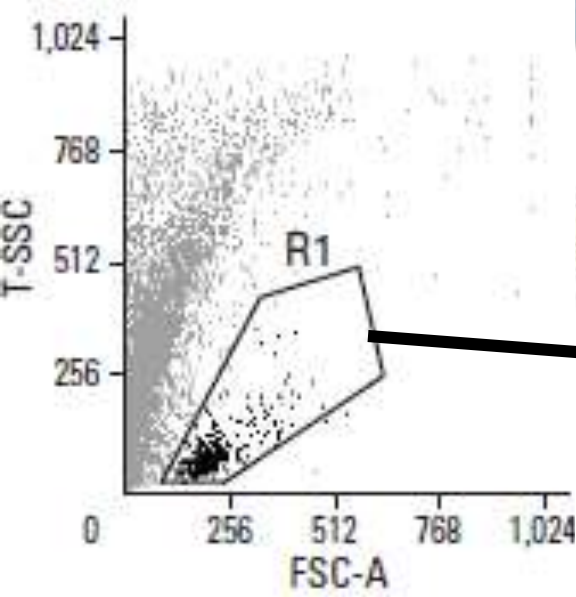
## Βασική αρχή

Τα MoAbs του ίδιου φθοριοχρώματος αναγνωρίζουν μόρια διαφορετικών κυτταρικών σειρών ή μόρια που **δεν** συνεκφράζονται φυσιολογικά

Καθορισμός του ποιος από τους δύο δείκτες αξιολογείται με βάση την ταυτοποίηση, επιλογή και οριοθέτηση (gating) της σειράς με τη βοήθεια τρίτου MoAb

## Παράδειγμα προτεινόμενου panel με συνδυασμούς δυο MoAbs στο ίδιο φθοριόχρωμα

Laser		Μπλε (488 nm)				Κόκκινη (635nm)
Πληθυσμός προς ανίχνευση	No σωληναρίου	FITC	PE	PE-TR	PEC5	APC7
Άγνωστος	1	CD8+λ	CD56+κ	CD45	CD4+CD19	CD3
	2	CD5	CD10	CD45	CD19	CD22
B	1	κ	λ	CD19	CD45	CDx
	2	CD20	CD10	CD45	CD19	CDx
T	1	CD8	CD7	CD5	CD4	CD3
	2	CD2	CD56	CD5	CD7	CD3
ΟΛ	1	CD34	CD10	CD45	CD7	CD19
ΟΜΛ	1	CD5	CD10	CD45	CD7	CD19
ΟΜΛ	1	CD34	CD117	CD45	CD33	HLADR
ΠΜ	1	CD38	CD138	CD45	CD56	CD19





# OMIP-010: A New 10-Color Monoclonal Antibody Panel for Polychromatic Immunophenotyping of Small Hematopoietic Cell Samples

Frank W. M. B. Preijers,\* Erik Huys, Bijan Moshaver

Table 2. Reagents used in OMIP-010

LASER	MAB	CLONE	FLUOROCHROME	SOURCE <sup>a</sup>
Blue (488 nm)	CD34	581	FITC	BC
	Ig-kappa	Polyclonal rabbit antihuman	FITC	DAKO
	CD7	8H8.1	PE	BC
	Ig-lambda	Polyclonal rabbit antihuman	PE	DAKO
	CD10	ALB1	ECD	BC
	CD4	T4	PECy5.5	BC
	CD56	NKH-1	PECy7	BC
Violet (405 nm)	CD117	4G7	PECy7	BC
	CD15	80H5	PB	BC
	CD20	HRC20	PB	BC
	CD45	J33	KO	BC
Red (638 nm)	CD3	UCHT1	APC	BC
	CD33	D3HL60.251	APC	BC
	CD8	T8	APC-Ax700	BC
	CD19	J4.119	APC-Ax750	BC

← Αρχική οριοθέτηση

APC, allophycocyanin; Ax, Alexa; Cy, cyanin; ECD, energy coupled dye (PE coupled to Texas Red); FITC, fluorescein isothiocyanate; KO, Krome Orange; PB, Pacific blue; PE, R-phycoerythrin.

<sup>a</sup> BC, Beckman Coulter, Marseille, France; DAKO, DAKO Glostrup, Denmark.

# **Ανάλυση σπανίων γεγονότων (rare event analysis)**

# Εφαρμογές της ανάλυσης σπανίων γεγονότων

Ελάχιστη Υπολειμματική Νόσος (MRD)

Αρχέγονα Αιμοποιητικά κύτταρα

Αντιγονοειδικά T –λεμφοκύτταρα με MHC τετραμερή τάξης I και II

Σπάνιοι υποπληθυσμοί T –λεμφοκυττάρων  
(iNKT, in vivo αποπτωτικά, με έκκριση κυτταροκινών)

Δενδριτικά κύτταρα

Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα

Αρχέγονα Καρκινικά Κύτταρα (Cancer Stem Cells)

Κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα

Μεσεγχυματικά κύτταρα

Εμβρυομητρική Κυκλοφορία

Ανίχνευση Λευκών σε ασκούς αιμοδοσίας

# Σπάνιοι πληθυσμοί

Ορισμός:

<0,1% επί του συνόλου των κυττάρων

Θα πρέπει να γίνει:

Ανίχνευσή τους

Ταυτοποίησή τους και διαχωρισμός τους από τα υπόλοιπα σήματα

Περαιτέρω μελέτη τους

# Προβλήματα που πρέπει να λυθούν

Μελέτη όσο το δυνατό  
μεγαλύτερου αριθμού  
κυττάρων στόχων

Πόσα;;;;;

Συμπύκνωση του  
δείγματος

Ταυτοποίησή τους και  
διαφοροποίησή τους  
από το «θόρυβο»

Βελτιστοποίηση σχέσης  
σήματος /θορύβου  
(signal to noise ratio)

# Πόσα κύτταρα συνολικά πρέπει να μελετηθούν;

Αυτό καθορίζεται από τον επιθυμητό αριθμό των κυττάρων στόχων

Ο αριθμός κυττάρων «στόχων» (N)  
καθορίζεται από το επιθυμητό CV  
(Coefficient of Variation δείκτης ακρίβειας της μεθόδου)  
ως εξής:

$$CV = 100/SD = 100/\sqrt{N}$$



$$N = [100/CV]^2$$

Ο συνολικός αριθμός κυττάρων που χρειάζονται για να  
επιτευχθεί ο παραπάνω αριθμός (N)

**εξαρτάται από το ποσοστό του πληθυσμού στόχου επί του  
συνόλου**

## Πίνακας υπολογισμού απαιτούμενου συνολικού αριθμού κυττάρων

Για CV (%):		1,0	2,5	5,0	10	20
Απαιτούμενος αριθμός κυττάρων στόχων		10.000	1.600	400	100	25
Αναμενόμενο % του πληθυσμού επί του συνόλου		Απαιτούμενος συνολικός αριθμός κυττάρων				
%	1:N					
10	10	100.000	16.000	4.000	1.000	250
1	100	1.000.000	160.000	40.000	10.000	2.500
0,1	1.000	10.000.000	1.600.000	400.000	100.000	25.000
0,01	10.000	100.000.000	16.000.000	4.000.000	1.000.000	250.000
0,001	100.000	1.000.000.000	160.000.000	40.000.000	10.000.000	2.500.000

# Πώς επιτυγχάνεται μεγάλος αριθμός σημάτων;;;

Μέγιστη δυνατή αύξηση  
ταχύτητας ροής;;; → ΟΧΙ τόσο ασφαλές → Κίνδυνος για «διπλέττες»  
↑CV

Συμπύκνωση του δείγματος → ενδείκνυται



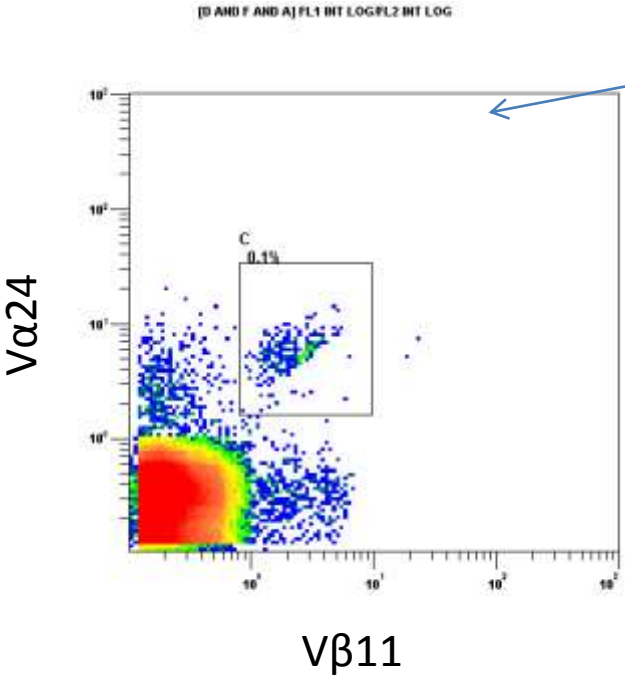
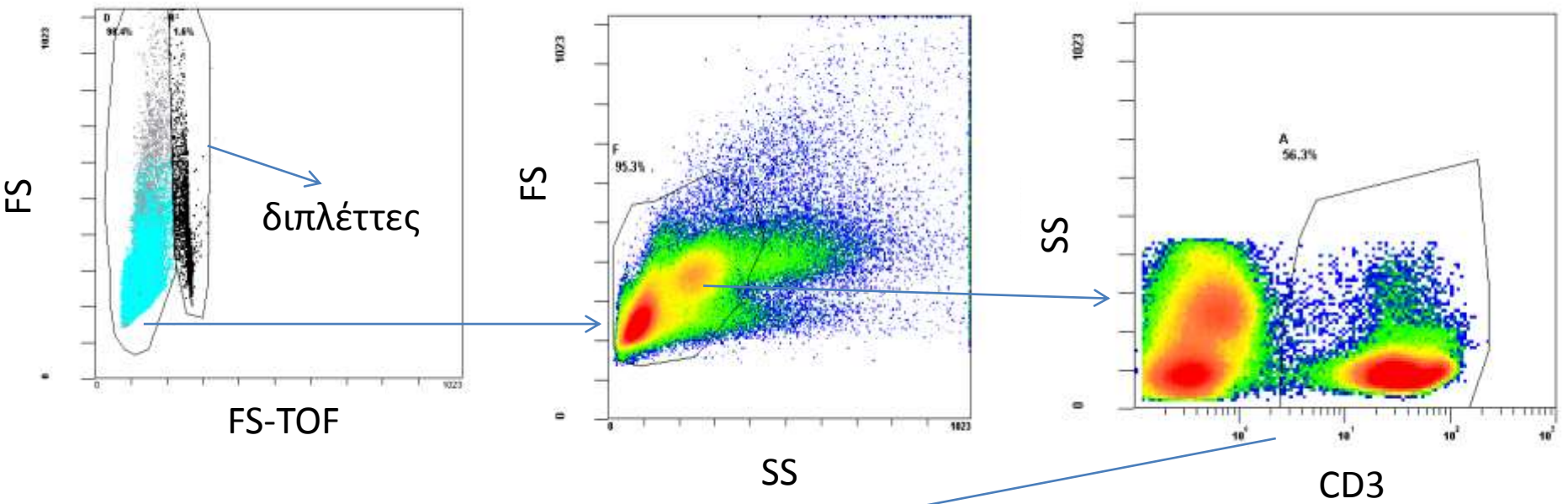
Πώς;;;



- Απλή φυγοκέντρωση αρχικού δείγματος
- Επιλογή PBMCs με Ficoll
- Ανοσομαγνητικά σφαιρίδια

Επίσης: χρήσιμη η ηλεκτρονική συνένωση αρχείων (data merging)





Παράδειγμα συμπύκνωσης δείγματος με ficoll  
 Το ποσοστό των CD3+ ανέβηκε από το 10% στο 50%.

Για να ανιχνευτούν 247 iNKT, μετρήθηκαν συνολικά  
 500.000 κύτταρα.

Για να έχουμε ανάλογο αποτέλεσμα, θα έπρεπε να  
 είχαν μετρηθεί 2.000.000 κύτταρα, αν δεν είχε γίνει  
 συμπύκνωση.

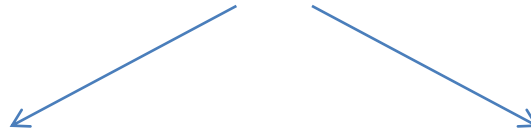
# Σχέση σήματος / θορύβου

Καθορίζει την ευαισθησία της μεθόδου



Καθορίζει το μικρότερο δυνατό % του πληθυσμού στόχου που είναι δυνατό να διαχωριστεί από το θόρυβο

Βελτιστοποίηση με



↓ θορύβου

↑ σήματος

# Θόρυβος

## Αίτιο

## Λύση

Μη ειδικές συνδέσεις



Επιλογή κατάλληλου αντιδραστηρίου  
Αποκλεισμός κυττάρων με ↑ % μη ειδικών συνδέσεων (π.χ. μονοκύτταρα) με dump channel  
Χρήση blocking serum

Αυτοφθορισμός  
(ιδίως νεκρά ή αποπτωτικά  
κύτταρα)  
Κυρίως σε φάσμα εκπομπής  
του FITC



Αποκλεισμός νεκρών  
κυττάρων



FS/SS

Χρωστικές [PI, 7AAD,  
SYTOstains (SYTO-16)]

Διπλέττες



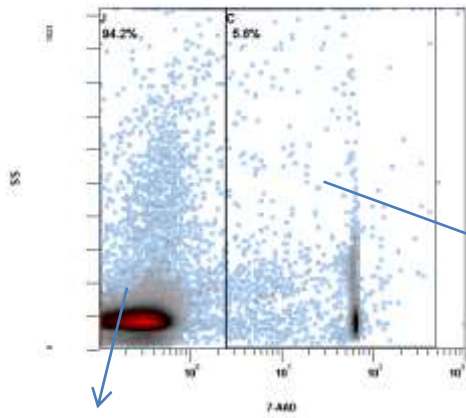
Αποκλεισμός διπλεττών με μελέτη μορφής  
ηλ. παλμού FS/FSTOF

Παραμονή κυττάρων  
ή χρωστικών από  
προηγούμενο δείγμα



ΣΧΟΛΑΣΤΙΚΟΣ καθαρισμός μηχανήματος  
ακόμη και πριν από κάθε ένα σωληνάριο!

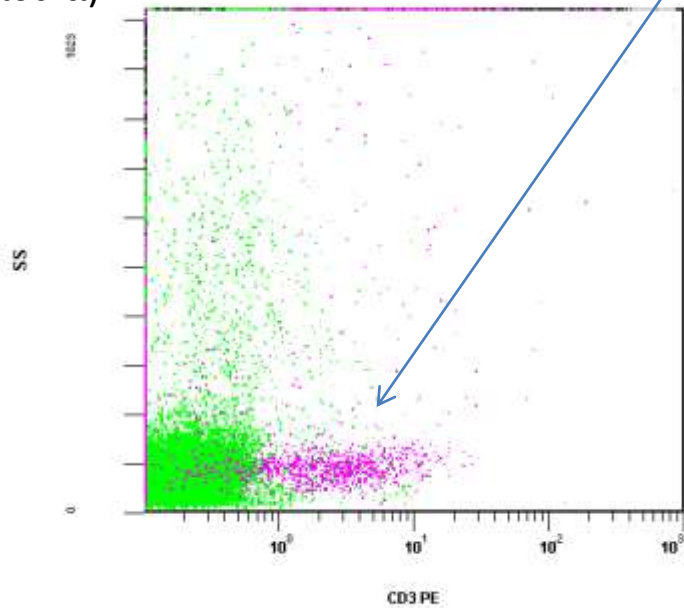
# Παράδειγμα χρήσης χρωστικής 7AAD



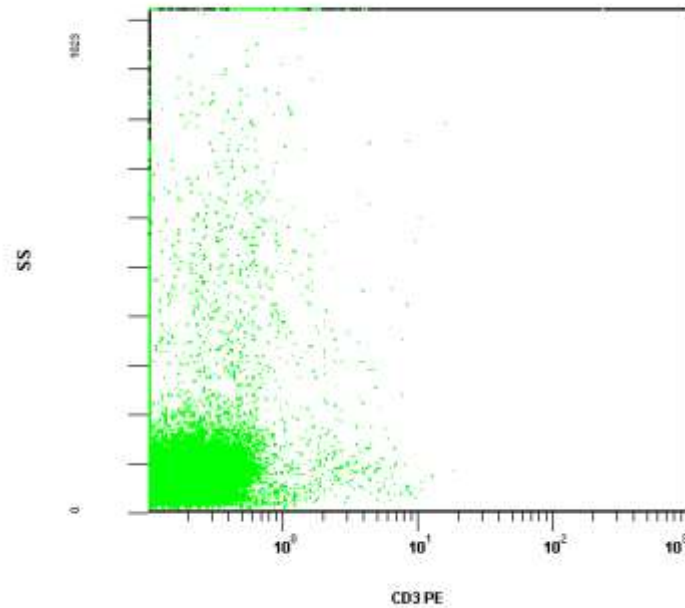
7AAD-  
Ζωντανά  
(πράσινα)

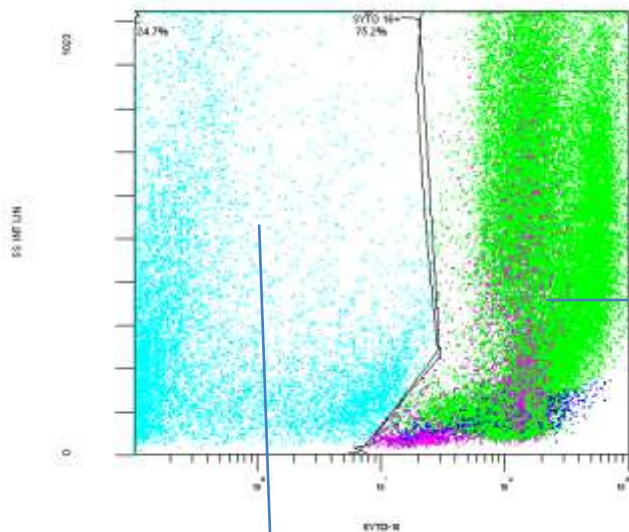
7AAD+  
Νεκρά κύτταρα  
(φούξια)

ungated



gated στα 7AAD-





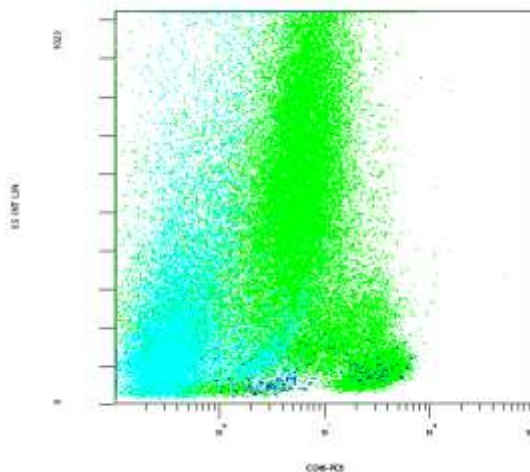
## Παράδειγμα χρήσης χρωστικής SYTO-16

SYTO-16+:

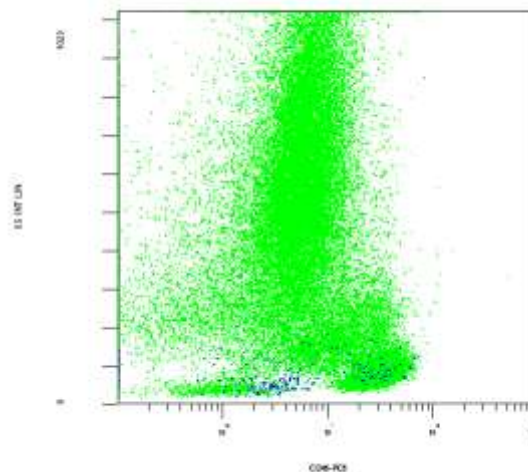
Ζωντανά εμπύρνηνα κύτταρα

SYTO-16-:  
Νεκρά/αποπτωτικά κύτταρα,  
άλυτα ερυθρά,  
debris

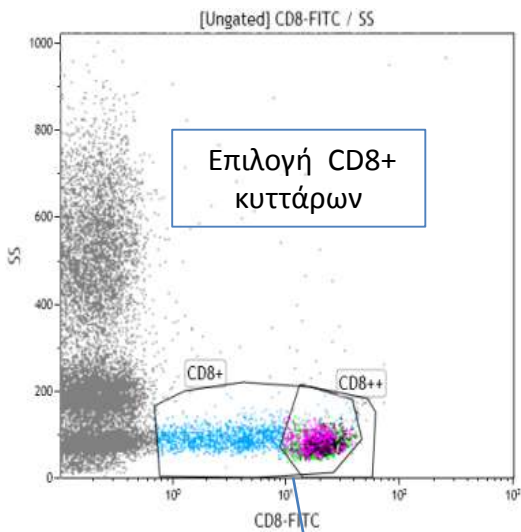
ungated



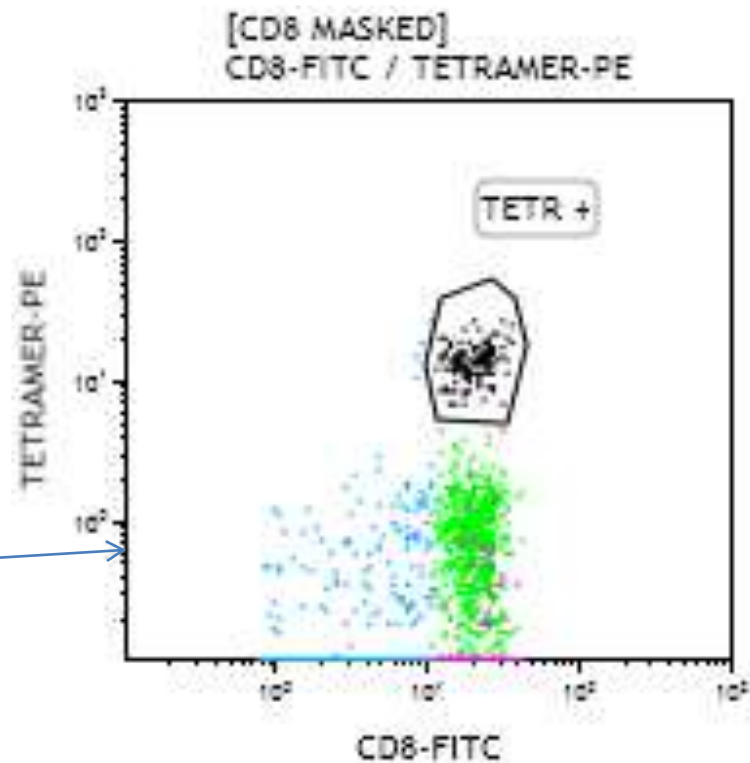
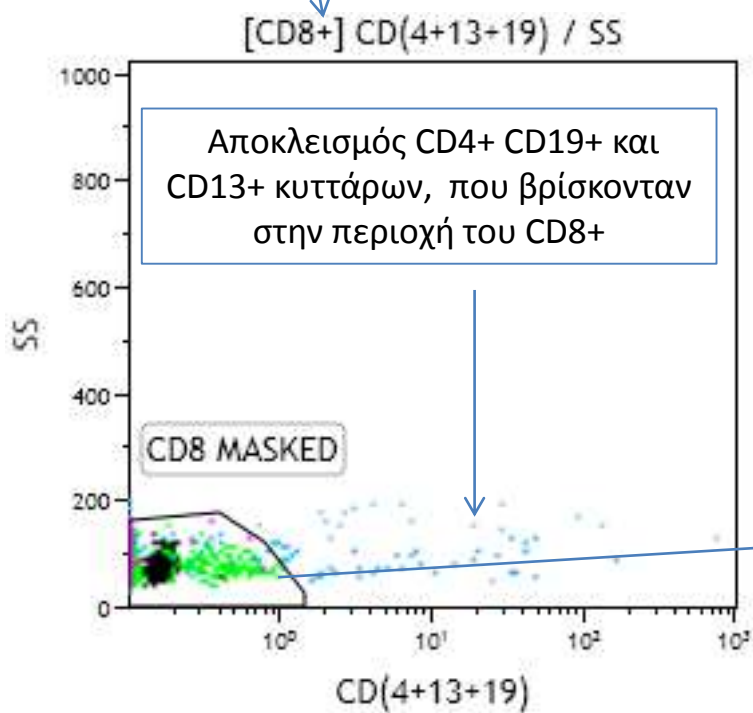
gated στα SYTO-16+



**Πρόσθετο πλεονέκτημα: Παρέχει σταθερό/αντικειμενικά μετρήσιμο παρονομαστή (ζωντανά εμπύρνηνα κύτταρα) στον υπολογισμό του ποσοστού των σπανίων κυττάρων**



## Παράδειγμα χρήσης dump channel



# Έλεγχος συνολικού θορύβου

## Αρνητικό control:

% των ψευδώς αρνητικών σημάτων καθορίζει ευαισθησία μεθόδου

Με δεδομένο το % των ψευδώς αρνητικών ,  
η μέτρηση μεγαλύτερου αριθμού κυττάρων  
βελτιώνει την ακρίβεια και ΟΧΙ την ευαισθησία.

Αρνητικό control μπορεί να είναι

Κλινικό (δείγματα σίγουρα αρνητικά.- πχ. Αίμα ασθενούς που ΔΕΝ φέρει το HLA A\*0201 για έλεγχο HLA A\*0201 τετραμερών)

Ισοτυπικό

Προσοχή σε

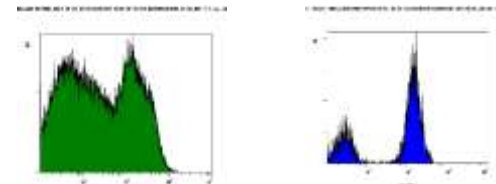
- συγκέντρωση
- σχέση φθοριοχρώματος/  
πρωτεΐνης

# Σήμα

Αύξηση της έντασης του σήματος με:

Χρήση έντονων φθοριοχρωμάτων (πχ PE) για σήμανση του πληθυσμού στόχου.

Χρήση αντιδραστηρίων με  $\downarrow$  CV θετικού σήματος



Επίσης

OXI

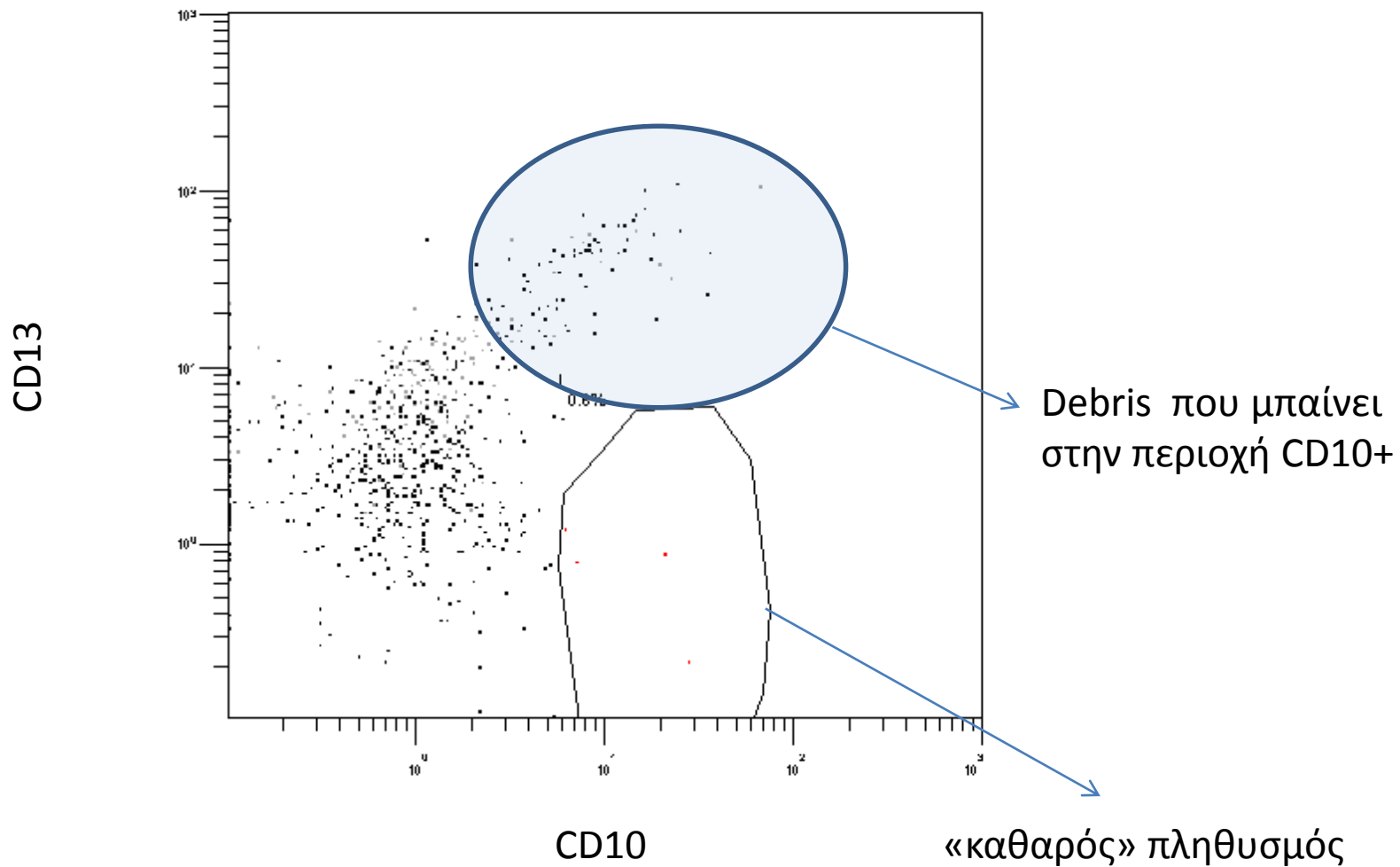
NAI

Σήμανση με τουλάχιστον 2 θετικούς δείκτες. «Αραίωση» του θορύβου είναι λογαριθμική συνάρτηση του αριθμού των χρησιμοποιούμενων φθοριοχρωμάτων

Χρήση ενός ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ δείκτη!!! Η επιλογή του αρνητικού σήματος αποκλείει debris, που συνήθως δίνει μη ειδικό θετικό σήμα.

Χρήση της παραμέτρου του χρόνου για ανίχνευση δεδομένων που ξεφεύγουν από την αναμενόμενη κατανομή Poisson, (μικρές κυτταρικές συναθροίσεις, φυσσαλίδες αέρα)

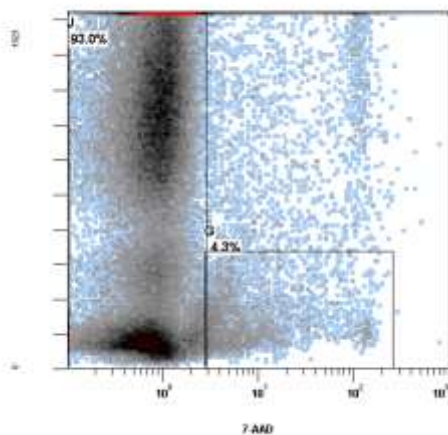




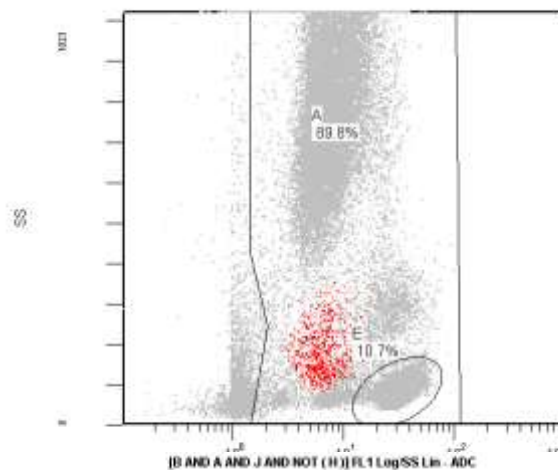
Σημασία χρήσης αρνητικού δείκτη

# Στρατηγική ανάλυσης back gating

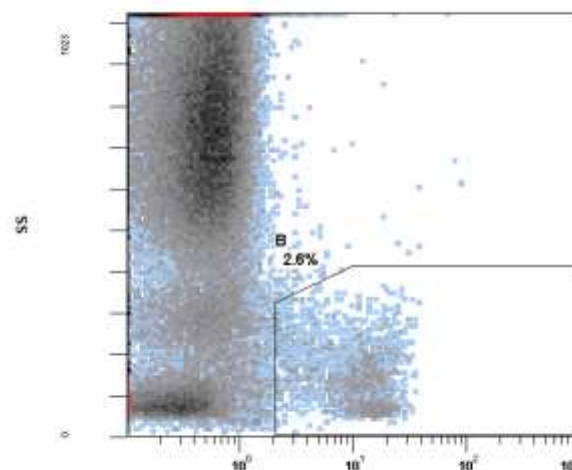
[NOT (H)]FL1 LogSS Lin - ADC



[NOT (H)]AND J]FL1 LogSS Lin - ADC

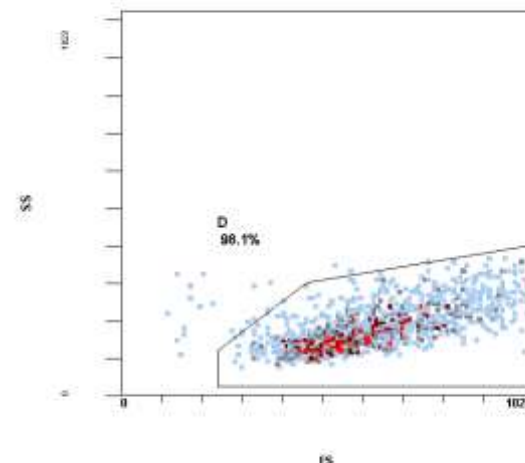
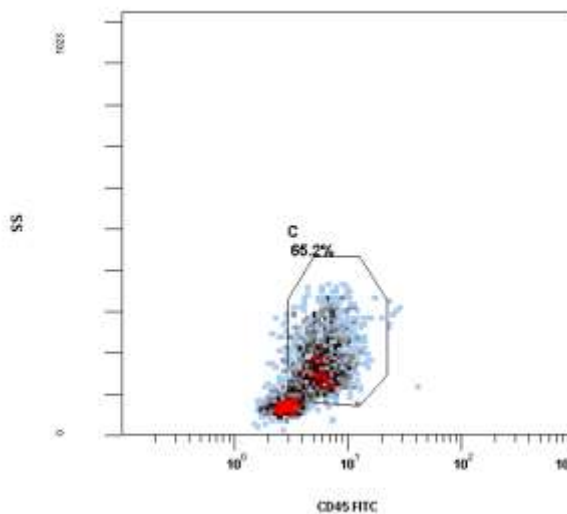


(75000 [A AND NOT (H)] AND J]FL2 LogSS Lin - ADC



[B AND A AND J AND NOT (H)]FL1 LogSS Lin - ADC

(75000 [B AND A AND J AND NOT (H)] AND C]FS LinSS Lin - ADC



*Not everything  
that can be  
counted counts  
and not  
everything  
that counts  
can be counted*

