

Überprüfung der automatisierten Bestimmung hämatopoetischer Progenitorzellen am XN – 20 der Firma Sysmex

Kamen Pavlov , Klasse BMA 18-21

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Zentrum für Labormedizin, Hämatologie, Insel Spital Bern

1. Zusammenfassung

Bis jetzt werden die Messungen im Rahmen von Stammzelltherapien durchflusszytometrisch mittels Immunphänotypisierung der CD34+ Zellen durchgeführt. Das Verfahren dauert 30 Min bis 1 Stunde. Um diese Zeit zu verkürzen überprüft das Zentrum für Labormedizin (Inselspital Bern) die Einführung der automatisierten Zählung von hämatopoetischen Zellen (HPC) am XN-20 Sysmex Gerät, um den Zeitpunkt der Sammlung der Stammzellen vom peripheren Blut (Apherese) festzustellen. Statistisch wurden die Daten mittels Bland and Altman, Korrelation nach Pearson und Regression nach Passing Bablock ausgewertet. EDTA Vollblut-Proben (mit Ausnahme des Bereichs 10-20 M/L) zeigen eine zufriedenstellende Übereinstimmung beider Methoden. Werte von 22-24 M/L am XN-20 zeigen sich als geeignet für Beginn der Apherese. Bei Patientinnen/Patienten mit Multiplem Myelom liegt dieser Wert bei 66 M/L. Apherese-Zwischenwerte beider Methoden zeigen Diskrepanzen, besonders im Bereich 700 – 2000 M/L. In Bereichen mit Diskrepanzen sollen weitere Messungen durchgeführt werden.

2. Einleitung

Stammzellen befinden sich vorwiegend im Knochenmark und werden in Stammzelltherapien angesetzt bei Patientinnen/Patienten, bei denen vorherige Therapien keine Wirkung gezeigt haben. Anhand Stimulation mit der Gabe von G-CSF werden die Stammzellen vom Knochenmark ins periphere Blut befördert. Damit wird eine schonende Sammlung von Zellen (Apherese) erzielt. Als Goldstandard hat sich die Zellzählung von CD34+ Zellen mittels Immunphänotypisierung (IP) (nach ISHAGE Protokoll) etabliert und es werden Antikörper für die Detektion der Stammzellen verwendet.

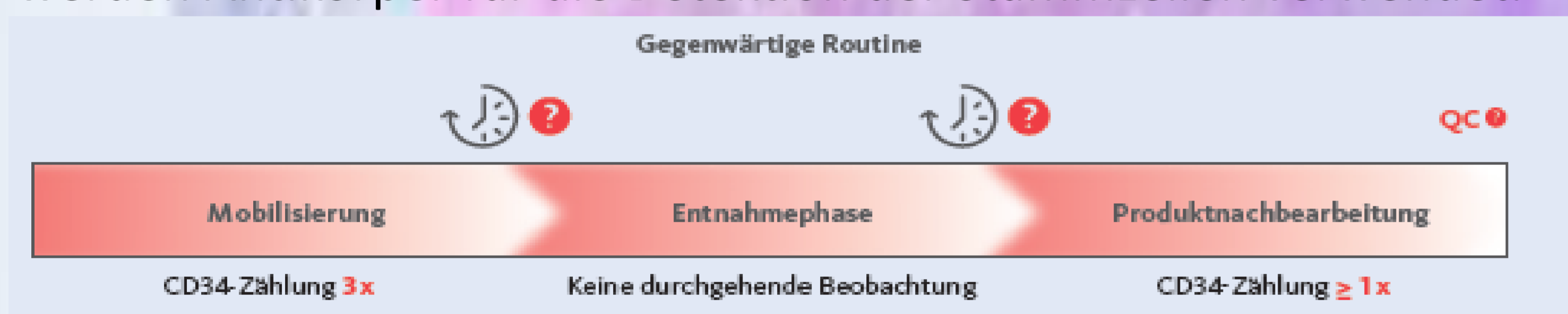


Abb.1 Gegenwärtige Routine (Sysmex, 2019)

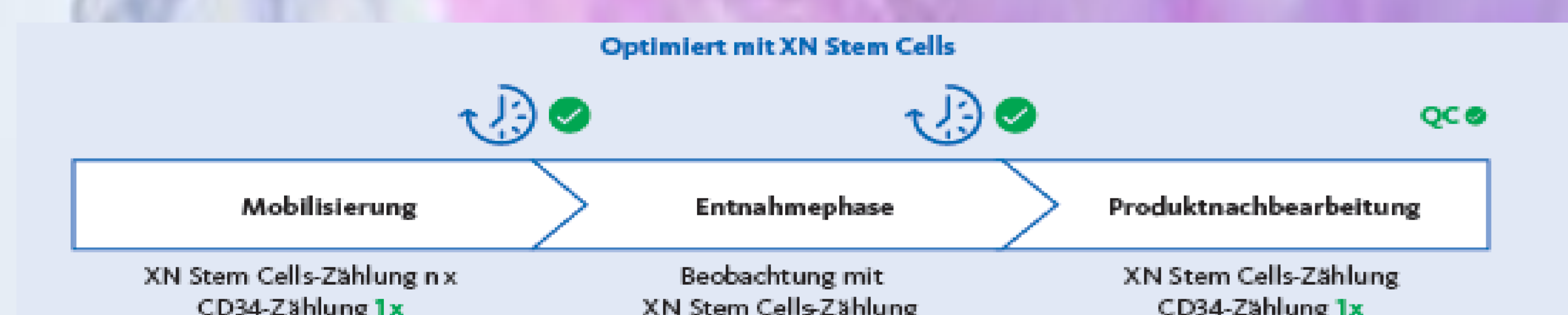


Abb.2 Optimierte Routine mit XN Stem Cells (Sysmex, 2019)

3. Ziele und Fragestellungen

- Messung der hämatopoetischen Vorläuferzellen am XN-20 zu überprüfen und diese zu den Werten der Durchflusszytometrie mittels Immunphänotypisierung zu vergleichen.
- Fragestellung: sind die XN-20 HPC-Werte so aussagekräftig wie die Resultate der IP bei der Entscheidung, ob die Stammzellapherese gestartet bzw. beendet werden kann?
- Prüfung der Probenmaterialien bei der Messung von HPC am XN-20 und der Eignung des Probenmaterials für die Durchführung der HPC-Messung am XN-20.
- Korrelieren die HPC-Werte mit den Werten von CD34+ Zellen (ISHAGE Protokoll) im EDTA Blut gleichermassen wie in Apherese-Proben?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Probenkollektiv: 236 Proben, 29 Männer, 21 Frauen – keine Ein-/Ausschlusskriterien – ausser sich zurzeit in Stammzelltherapie befindenden Patientinnen/Patienten.

Statistik: Korrelation nach Pearson (ideal wäre Koeffizient +1), Bland & Altman, Regression nach Passing Bablock

Messmethodik: HPC Modus im WPC Kanal am XN-20: HPC werden als mittelgrosse, geringfügig granuläre, und schwach Fluoreszenzlicht emittierende Zellen abgegrenzt. XN-20 saugt zuerst 88 µl PB oder Apherese Produkt und verteilt es auf die Kanäle. Nachher werden 102 µl angesaugt und zu den vier schon vorhandenen Proben zugegeben. Die Inkubationszeit unterscheidet sich von der üblichen Inkubationszeit des WPC Kanals.

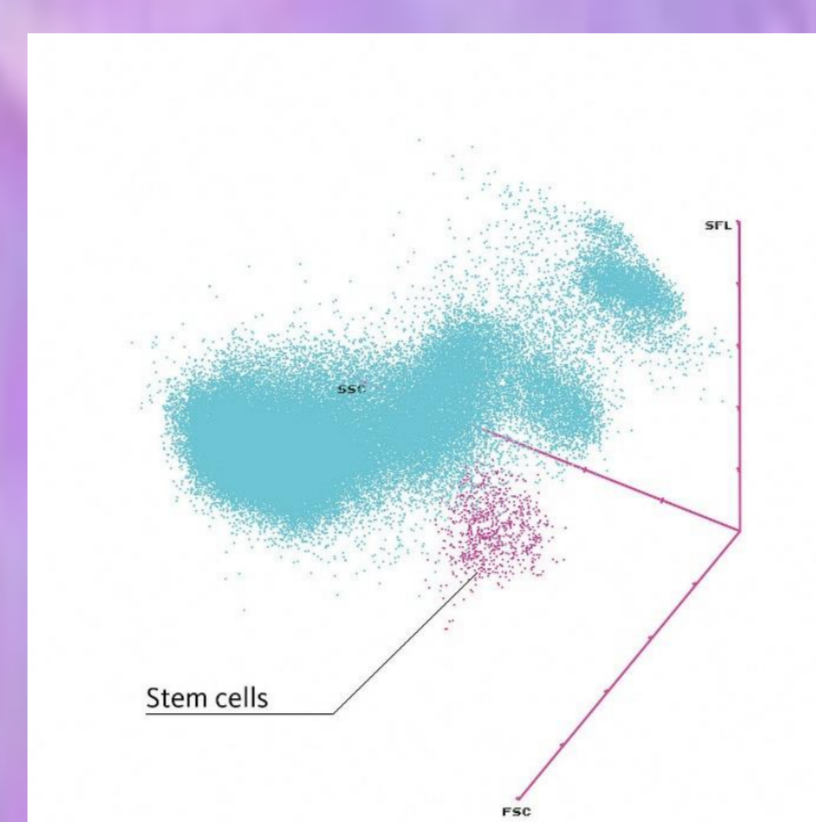


Abb.3 XN Stem Cells cluster (purple) in the 3D model of the WPC channel (n.d.)

5. Ergebnisse/ Resultate

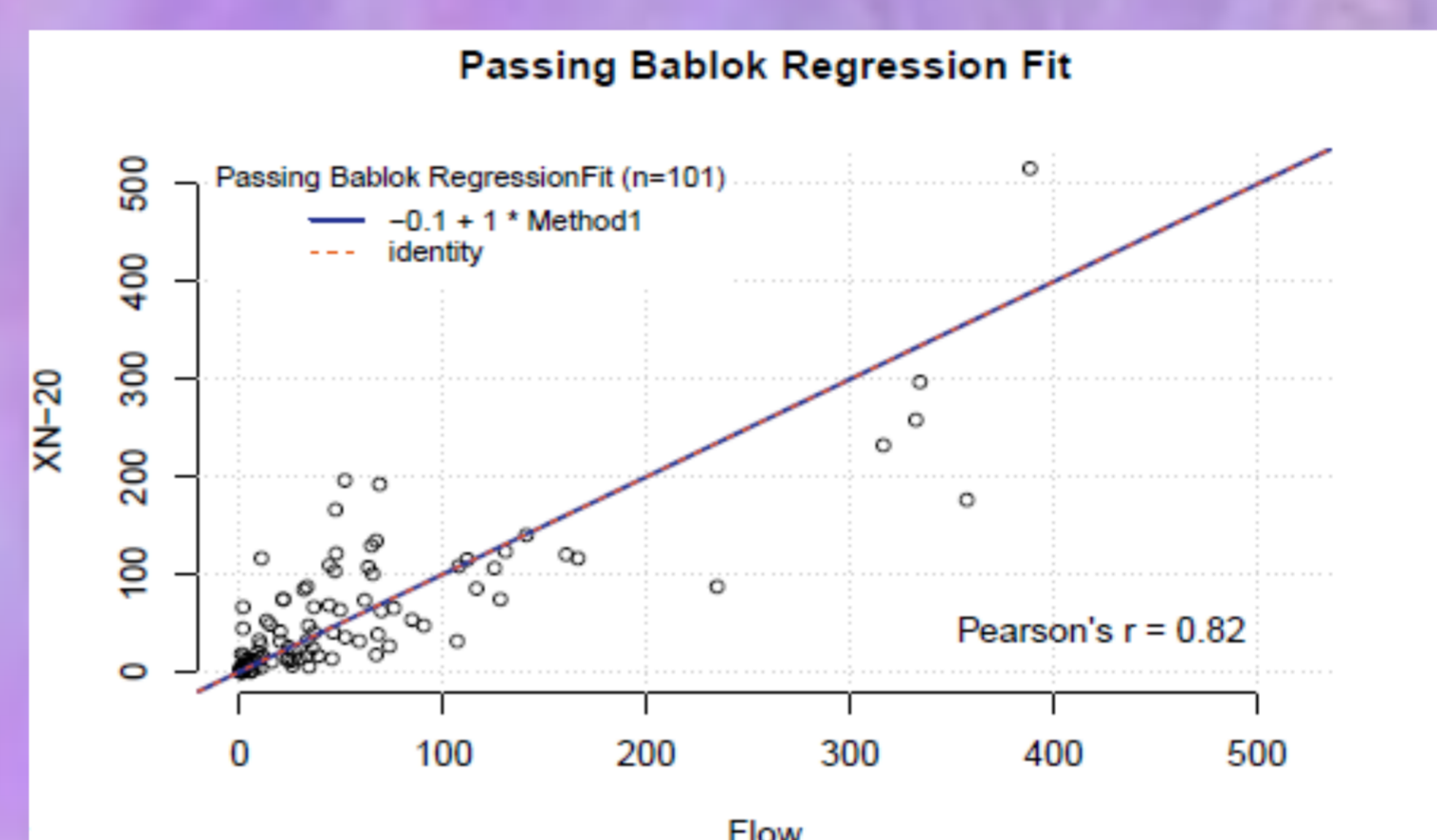


Abb.4 Flow vs. XN-20 bei EDTA Proben nach Passing Bablok (Pavlov, 2021)

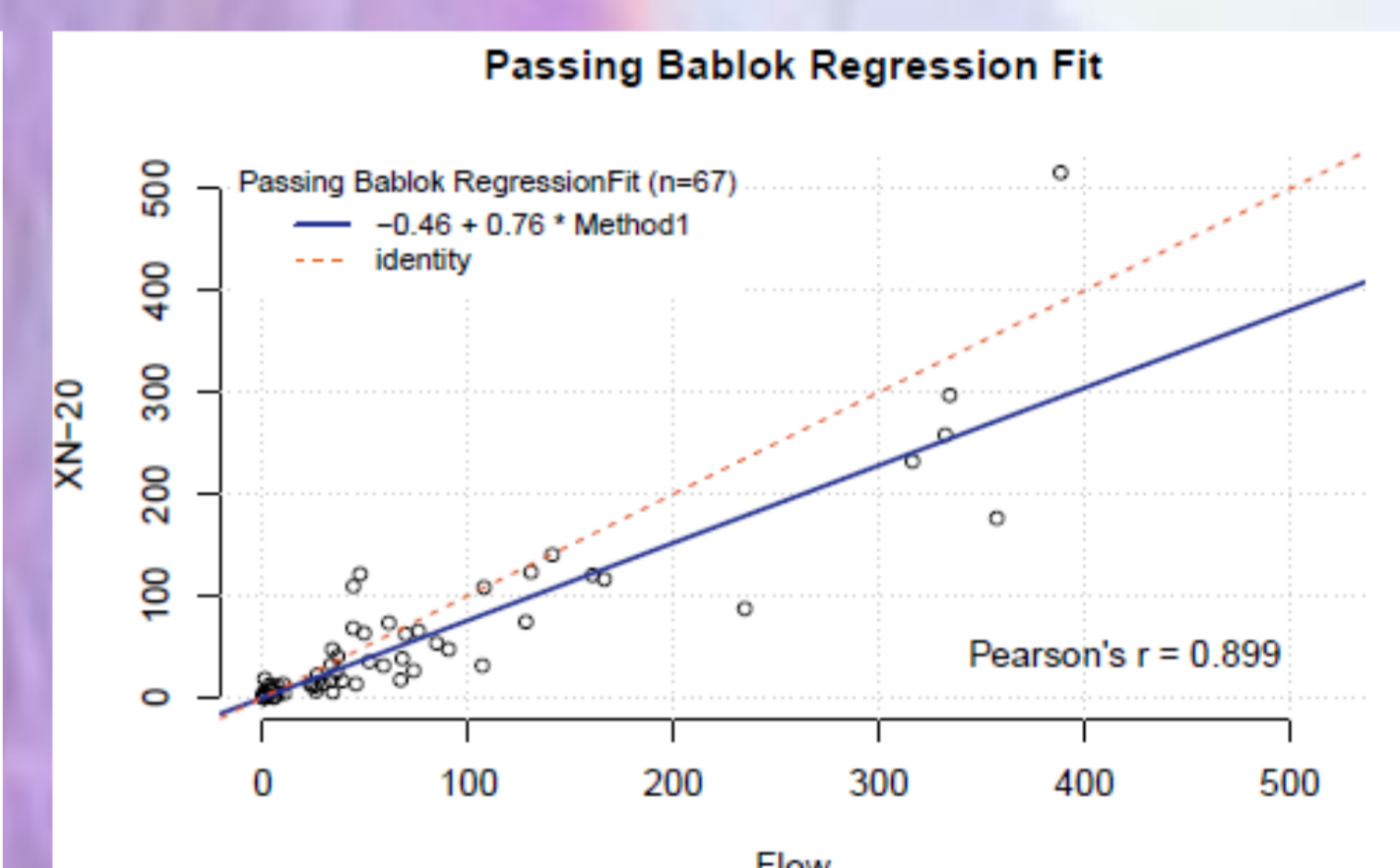


Abb.5 Flow vs. XN-20 bei EDTA Proben nach Passing Bablok (ohne MM) (Pavlov, 2021)

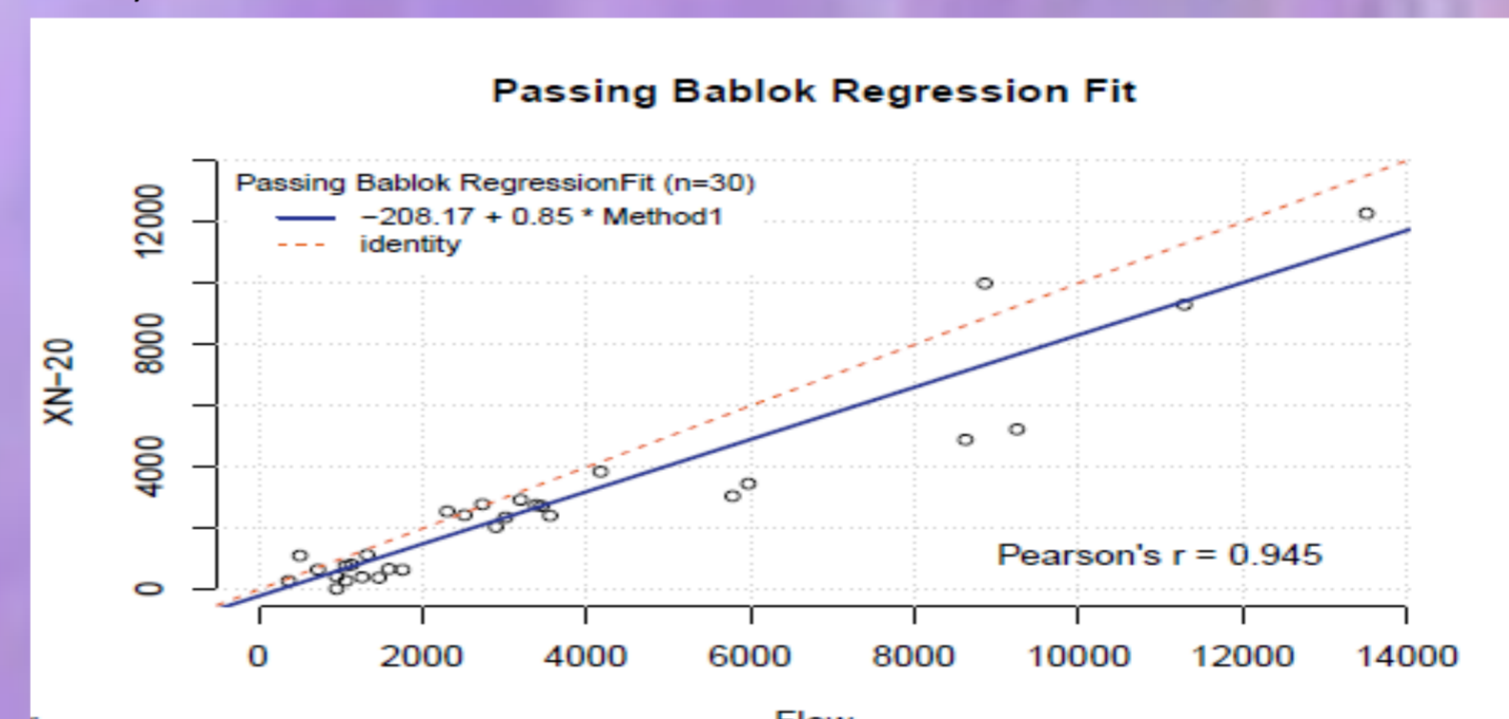


Abb.6 Apherese Proben nach Passing Bablok (ohne MM) (Pavlov, 2021)

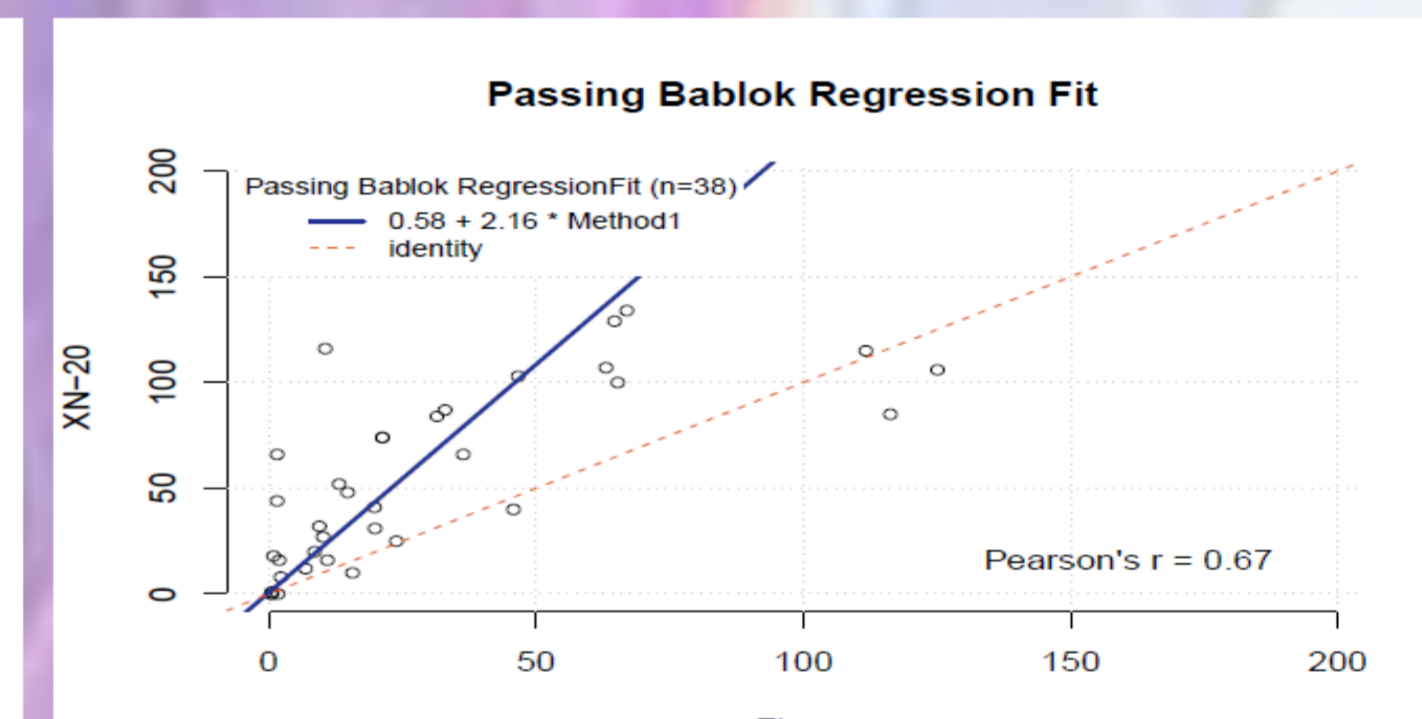


Abb.7 Apherese Proben nach Passing Bablok (nur MM) (Pavlov, 2021)

6. Diskussion

Übereinstimmung (EDTA Proben):				
Werte < 20 M/L	Werte 0-10 M/L (mit MM*)	Werte 0-10 M/L (ohne MM)	Werte > 20 M/L	EDTA (ohne MM) < 20 M/L
71.42%	66%	84%	75.60%	86.56%

Wert-Bereiche, die weiter überprüft werden müssen		
EDTA Proben	Apherese-Zwischenwerte	
10 – 20 M/L	< 700 M/L	1000 – 2000 M/L

Abb.9 Wert-Bereiche, die weiter überprüft werden müssen (Pavlov, 2021)

Abb.8 Übereinstimmung der gemessenen EDTA Proben am XN-20 mit der CD34+ Zellzahlbestimmung mittels IP (Pavlov, 2021)

Bei MM EDTA Proben sind 23 von 38 HPC Resultate 2.5- bis 3-fach höher als CD34+ Zellzählungen. Bei der Frage "Apherese Ja/Nein" zeigen HPC Messungen (EDTA ohne MM) eine Übereinstimmung von 81.82% mit der IP-Bestimmung. Diese Übereinstimmung kann deutlich verbessert werden, falls die untere HPC Grenze bei Beginn der Apherese bei 22-24 M/L statt 20 M/L liegt. Der tiefste HPC Wert, bei dem die Apherese begann, war 66 M/L – tiefere Werte würden zu einer verfrühten Apherese führen. Weiter abzuklären wäre, ob und inwiefern die ärztlichen Therapieentscheidungen von den Diskrepanzen in Apherese-Zwischenwerten beeinflusst werden.

Abbildungen

Abb. 1, 2 Sysmex AG. (2019). Stammzellzählung: Effizientes Monitoring der Stammzellapherese. Abgerufen von https://www.sysmex.de/fileadmin/media/f101/Produktflyer/Haematologie/HSCT_Management_Stammzellzaehlung_Effizientes_Monitoring_der_Stammzellapherese.pdf

Abb. 3 [XN Stem Cells cluster (purple) in the 3D model of the WPC channel]. (n.d.). Sysmex-Europe. Abgerufen von <https://www.sysmex-europe.com/n/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/haematopoietic-progenitor-cells-hpc.html>

Abb. 4-9 Pavlov, K. (2021). Bern