

Externí hodnocení kvality stanovení CD34+ buněk v České a Slovenské republice – dlouhodobé zkušenosti z osmiletého období

Lysák D.¹, Budina M.², Holubová M.^{1,3}, Jindra P.¹

¹Hematologicko-onkologické oddělení Fakultní nemocnice Plzeň

²SEKK, spol. s r. o., Pardubice

³Biomedicínské centrum LF Plzeň

Transfuze Hematol. dnes, 25, 2019, No. 3, p. 258-263

SOUHRN

Stanovení počtu CD34+ buněk průtokovou cytometrií je základní metodou pro hodnocení kvality transplantátů hemopoetických kmenových buněk a pro plánování leukaferéz k jejich odběru. Metoda je založena na víceparametrové průtokové cytometrii a je mezinárodně dobře standardizovaná. Program EHK pro CD34+ kvantifikaci je v rámci ČR a SR k dispozici od roku 2010 a účastní se jej více než 20 laboratoří. Vyhodnocení 8leté zkušenosti ukázalo výbornou dlouhodobou úspěšnost účastníků pohybující se mezi 80-100 % s ojedinělými výkyvy. Část účastníků, kteří jsou do programu zapojeni od začátku, dosahuje dokonce 90% úspěšnosti. Reprodukovatelnost výsledků měření je velmi závislá na množství CD34+ buněk ve vzorku. Při počtu CD34+ buněk nad 10/μl se pohybuje CV okolo 10 %, pod touto hladinou roste o desítky procent. Program hraje důležitou roli v harmonizaci měření CD34+ buněk mezi transplantačními centry a zvyšuje pravděpodobnost získání přesných a porovnatelných výsledků.

KLÍČOVÁ SLOVA

kontrola kvality – CD34+ – EHK – variabilita

SUMMARY

Lysák D., Budina M., Holubová M., Jindra P.

External quality control of CD34+ cell assessment in Czech and Slovak Republic – long-term experience from eight years

Determination of CD34+ cells by flow cytometry is a basic method for assessing the quality of hematopoietic stem cell grafts and for planning their collection by leukapheresis. This method is based on multiparameter flow cytometry and is well-standardized internationally. The EQA program for CD34 + quantification has been available in the Czech and the Slovak Republic since 2010 with more than 20 laboratories involved. Evaluation of the 8-year experience has shown an excellent long-term success of participating laboratories ranging between 80-100 %, with sporadic fluctuations. Some of the participants who have been involved in the program from the beginning, achieve even 90% success rates. Reproducibility of measurement results is highly dependent on the amount of CD34+ cells in the sample. CV oscillates around 10 % if the CD34+ count is 10/μL or higher and increases by dozens of percent below this level. The program plays an important role in harmonizing CD34+ determination between transplant centres and increases the likelihood of obtaining accurate and comparable results.

KEY WORDS

quality control – CD34+ – EQA – variability

ÚVOD

Transplantace hemopoetických kmenových buněk (autologní nebo alogenní) je dnes standardní léčebnou modalitou pro řadu hematologických nádorových, ale i nemaligních onemocnění. Množství kmenových buněk v transplantátu určuje kinetiku příhojení („*en-graftment*“) a ovlivňuje výsledek samotné transplantace bez ohledu na to, zda se jedná o kostní dřeň nebo mobilizované periferní kmenové buňky [1]. Přesné a reprodukovatelné měření krvetvorných buněk je zcela zásadní a má významný klinický dopad. Umožňuje nám posuzovat kvalitu transplantátů, monitorovat množství kmenových buněk v průběhu zpracování či manipulace se štěpy, ale slouží také ke správnému načasování aferéz při mobilizaci a odběru periferních kmenových buněk.

Standardně využívanou metodou stanovení kmenových buněk je detekce CD34+ buněk pomocí průtokové cytometrie. CD34+ buněčná frakce obsahuje hlavní část hemopoetické kapacity schopné zajistit rekonstrukci víceliniové hematopoézy [2]. Množství CD34+ buněk v transplantátu na kilogram hmotnosti příjemce je základním parametrem určujícím kvalitu štěpu. Jsou definovány doporučené dávky CD34+ buněk pro jednotlivé typy štěpů a transplantací [3]. Klonogenní testy založené na počítání kolonie tvořících jednotek mají oproti cytometrii některé nevýhody, z nichž nejvíce omezující je časová náročnost, ale také subjektivita hodnocení a omezená reprodukovatelnost a standardizace, a proto je jejich praktické využití omezené.

Pro cytometrické měření se využívají různé způsoby přípravy vzorku, různé protilátky, fluorochromy a „*gating*“ strategie. Zastoupení CD34+ buněk ve vyšetřovaných materiálech se pohybuje v širokém rozmezí od setin procent, resp. jednotlivých buněk na μl až po procenta, resp. stovky buněk na μl . V extrémních oblastech tohoto spektra, a to zejména při nízkých hodnotách na úrovni tzv. „*rare events*“, se dostává analytická metoda mimo své běžné limity.

Z výše uvedených důvodů byla vypracována řada národních a mezinárodních odborných doporučení pro CD34+ kvantifikaci, jejichž cílem je dosažení nízké intra- i mezilaboratorní variability [4, 5]. Východiskem je vždy víceparametrová průtoková cytometrie, která detekuje kmenové buňky na základě exprese znaků CD34 a CD45 zpravidla v kombinaci s vitálním barvením a zároveň využívá sekvenční „*gating*“ k vyloučení nespecifických událostí. Nejvíce rozšířený je postup navržený mezinárodní společností pro buněčnou terapii (www.isct.org, dříve ISHAGE) [4].

V řadě studií byla i přes harmonizační snahy porovnána významná variabilita výsledků mezi jednot-

livými transplantačními centry, která poukázala na skutečnost, že výsledek CD34+ měření je ovlivněn řadou proměnných, jako je typ vzorku a jeho zpracování, zkušenost personálu, analýza naměřených dat apod. [6–8]. S ohledem na komplexnost CD34+ kvantifikace, její sklon k mezilaboratorní variabilitě na straně jedné a velký klinický dopad na straně druhé, je důležitou součástí tohoto stanovení externí hodnocení kvality (EHK), které umožňuje zúčastněným laboratořím nezávisle porovnávat své výsledky a ověřovat správnost svých měření. Národní program EHK pro CD34+ kvantifikaci je v České republice k dispozici od roku 2010. Cílem tohoto sdělení bylo vyhodnotit dlouhodobou zkušenost s programem EHK pro stanovení CD34+ buněk za osmileté období, shrnout jeho výsledky a případné trendy.

MATERIÁL A METODIKA

Organizace a metodika hodnocení EHK

Program externího hodnocení kvality pro stanovení CD34+ buněk obsahuje každý rok dva cykly v jarním a podzimním termínu. Vzorky jsou připravovány centrálně na pracovišti supervizora. Jedná se o periferní krev pacientů mobilizovaných k odběru autologních hemopoetických kmenových buněk. Pacienti musí být negativní na základní infekční markery (HBsAg, anti-HBc, anti-HCV, syfilis, anti-HIV, p24 Ag) a musí podepsat informovaný souhlas.

Krev je ihned po odběru „*aliquotována*“ (rozdělena do více zkumavek pro další analýzu) a ošetřena stabilizačním roztokem TransFix podle doporučení výrobce (Cytomark, Buckingham, UK). Příprava probíhá v závislosti na kinetice vyplavení CD34+ buněk koncem týdne, účastníkům jsou vzorky odesílány v pondělí. Oproti jiným programům EHK zde není den rozesílání vzorků účastníkům stanoven předem a upřesňuje se e-mailem v závislosti na dostupnosti vhodných vzorků. Účastníci realizují měření na různých typech cytometrů, s využitím různých reagentů a různých analytických software, neprovádí se žádná mezilaboratorní metodologická ani přístrojová standardizace. Od druhé poloviny roku 2013 účastníci dostávají 2 vzorky (do té doby byl rozeslán jen jeden vzorek). V rámci každého cyklu se provádí na pracovišti supervizora studie stability, která ověřuje kvalitu vzorků po dobu 4 dnů od rozeslání, protože v tomto období provádějí účastníci měření.

Program EHK hodnotí vždy celkem tři zkoušky, které účastníci uvádějí ve výsledkových listech: absolutní počet leukocytů (WBC $10^9/\text{l}$), relativní počet CD34+ buněk ($\text{CD34+}_{\text{REL}}$, %) a absolutní počet CD34+

Tab. 1. Kritéria pro nastavení maximální povolené odchylky výsledků od vztažné hodnoty

Zkouška	Jednotka	Kritérium (D_{max})	Poznámka
Leukocyty	$10^9/l$	$\pm 15\%$ z AV	
CD 34+ _{ABS}	počet/ μl	$\pm 1,25$ (absolutně) $\pm 25\%$ z AV	pro AV do 4,999 buněk/ μl pro AV ≥ 5 buněk/ μl
CD34+ _{REL}	%	$\pm 0,025$ (absolutně) $\pm 25\%$ z AV	pro AV 0 až 0,099 % pro AV $\geq 0,1\%$

buněk (CD34+_{ABS}, počet/ μl). Při zpracování výsledků se jako vztažné hodnoty (AV) používají robustní průměry (RoM). Maximální povolené odchylky výsledků účastníků od vztažné hodnoty (tzv. D_{max}) jsou nastaveny podle kritérií uvedených v tabulce 1.

Na základě D_{max} je stanoveno rozmezí ohraničené dolní (LL) a horní (UL) mezí, které definuje „správný“ výsledek pro hodnocení úspěšnosti účastníka v dané zkoušce. Úspěšnost je vyjádřena i graficky v Youdenových grafech (graf 1). Nejdůležitějším hodnoceným parametrem je absolutní počet buněk CD34+, který zahrnuje celý proces měření a nejlépe odráží celkovou výkonnost laboratoře pro tuto analýzu.

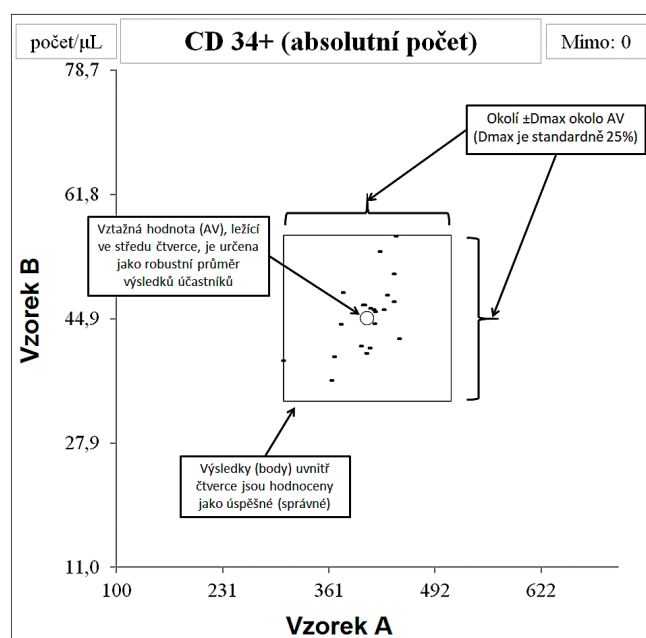
Účastníci cyklu EHK obdrží individuální hodnocení pro každou z výše uvedených 3 zkoušek, přičemž zkouška je hodnocena jako úspěšná tehdy, pokud účastník uvedl správný výsledek dané zkoušky pro oba vzorky. Kromě vlastního hodnocení dostávají účastníci i další informace, jako například počet účastníků

cyklu, rozptyl naměřených výsledků, celková úspěšnost apod.

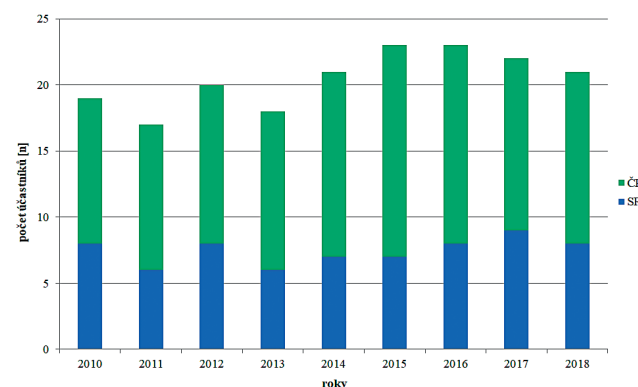
VÝSLEDKY

Dlouhodobé výsledky EHK

Bylo vyhodnoceno celkem 16 cyklů EHK pro stanovení CD34+ buněk, které proběhly v období 2010–2018. Stanovení CD34+ buněk je specifickou problematikou, která je vázána zejména na transplantační centra a větší centralizované laboratoře, proto se dotýká relativně menšího počtu účastníků. Do programu je dlouhodobě zapojeno přes dvacet laboratoří, z toho cca 40 % představují účastníci ze Slovenska (graf 2.).



Graf 1. Grafická prezentace úspěšnosti účastníků v Youdenově grafu (příklad)



Graf 2. Vývoj počtu účastníků v období 2010–2018

Celková úspěšnost (všichni účastníci) stanovení relativních a absolutních hodnot CD34+ buněk se většinou pohybovala mezi 80 do 100 % (graf 3). Uvedený graf rovněž ukazuje, že 3krát celková úspěšnost významně poklesla pod 80 %:

- V prvním cyklu roku 2010 celková úspěšnost jen mírně přesáhla 60 % – jednalo se o vůbec první cyklus EHK zaměřený na měření počtu CD34+ a nižší úspěšnost lze přičíst „počátečním obtížím“ (záměna jednotek, formální chyby při zápisu výsledků).
- V druhém cyklu roku 2013 dosáhla celková úspěšnost jen 65 % – tento cyklus byl první, ve kterém jsme účastníkům začali posílat 2 vzorky, a tím skokově vzrostla

Stanovení absolutního počtu CD34+ buněk je možné buď výpočtem z absolutního počtu leukocytů změřeného hematologickým analyzátozem a procenta CD34+ buněk stanoveného průtokovým cytometrem (*dual platform* metoda, DP), nebo je možné jej získat přímo z cytometru pomocí vhodného kalibračního standardu (*single platform* metoda, SP). Kolem 60 % účastníků využívá metodu SP, cca 40 % metodu DP (ovšem někteří účastníci metodu měření neuvádí a někteří účastníci metody měření mezi jednotlivými cykly střídají).

DISKUSE

Kvantifikace CD34+ buněk představuje speciální laboratorní metodu, která má zásadní význam pro hodnocení kvality transplantátů hemopoetických kmenových buněk a posuzování efektivity mobilizace a odběru periferních kmenových buněk pro účely autologních i alogenních transplantací, stejně jako se uplatňuje v rámci diferenciatní diagnostiky myeloproliferativních neoplazií. Přesné stanovení počtu krvetvorných kmenových buněk je v transplantační medicíně zásadní. Dávka životaschopných CD34+ buněk je kritickým parametrem pro dlouhodobé přijetí a jsou stanovené minimální požadavky na kvalitu transplantátů.

Externí hodnocení kvality je důležitou součástí systému kontroly kvality klinické laboratoře. EHK napomáhá odhalení možných problémů v laboratorní analýze a identifikaci jejich příčin. Účast v programech EHK je zároveň příležitostí pro ověřování způsobilosti pracovníků a také jedním z důležitých akreditačních požadavků.

Program externího hodnocení kvality stanovení počtu CD34+ buněk byl v České republice a na Slovensku zahájen v roce 2010. Výsledky programu CD34+ jsou uspokojivé, celková úspěšnost v posledních letech se pohybuje nad 80 %. Přes vysokou míru standardizace, které bylo pro tuto analýzu celosvětově dosaženo (doporučené postupy pro měření, hodnocení výsledků, validované kity a cytometrické moduly), existuje stále určitá mezilaboratorní variabilita daná řadou okolností, jako jsou typ a nastavení cytometru, příprava vzorku, analýza dat atd. Tato variabilita může být snížena hlavně díky maximálnímu sjednocení protokolů a edukaci personálu, jak potvrdila multicentrická studie ve 24 evropských centrech, kdy se po implementaci standardizovaného postupu podařilo snížit mezilaboratorní CV z 23 % na 11 % [6]. V rámci EHK pak nelze jako jeden z faktorů zvyšujících variabilitu výsledků opominout ani vlastnosti samotných vzorků, které ve srovnání se vzorky pacientů obsahují stabilizační roztok, který umožňuje krátkodobé skladování a následný transport od poskytovatele do laboratoře účastníka.

Reprodukovatelnost výsledků (mezilaboratorní variabilita) byla v naší analýze ovlivňována zejména zastoupením CD34+ buněk v kontrolním vzorku. Průměr CV pro vzorky s vyloučením extrémně nízkých hodnot byl 13 %. Ovšem CV významně narůstalo při poklesu množství CD34+ buněk pod 10, resp. 5 buněk/ μ l. Variabilita měření ve stabilitních studiích se pohybovala do 10 %. Reprodukovatelnost uváděná v multicentrických studiích se pohybuje od 10 do 28 %, a to často na vzorcích s vyšším zastoupením CD34+ buněk, kde je variabilita přirozeně nižší [6, 9].

Přestože klinická relevance intra- i interlaboratorní variability je v nízkých hodnotách zpravidla zanedbatelná, je zařazování takovýchto vzorků do EHK důležité. Jednak odráží běžnou klinickou situaci a zejména umožňuje i přes očekávaný vyšší rozptyl ověřovat laboratořím, že jejich výsledky spadají do řádově stejných rozmezí a nedochází k chybnému nadhodnocování množství CD34+ buněk. Zároveň by si laboratoře měly uvědomovat, že při nízkých hodnotách roste nejistota měření, a s tímto vědomím by měly výsledek interpretovat, případně provádět v indikovaných případech opakovaná měření vzorku a stanovovat z nich průměrné hodnoty. Ideálně by měla mít laboratoř stanovenou dvojí nejistotu měření, jednak pro vzorky v běžném klinickém rozmezí a jednak pro vzorky s nízkými počty buněk CD34+, a uvádět ji ve výsledkových listech. Jednou z možností snížení nejistoty měření je také zvýšení počtu načítaných událostí. Pro nízké hladiny CD34+ buněk by mělo být načítáno minimálně 200 tisíc událostí [10].

Dalším opatřením pro snížení variability měření je využití *single platform* metody, kdy je relativní i absolutní počet CD34+ buněk stanoven průtokovým cytometrem. Odstraněním hematologického vstupu a případných nepřesností vnášených do analýzy hematologickým analyzátozem, ale také např. zaokrouhlováním procenta CD34+ buněk, dochází k redukci počtu složek nejistoty měření v porovnání s *dual platform* metodou, jak prokázala řada studií [11, 12]. V rámci výsledků získaných v našem programu EHK se bohužel k uvedeným údajům můžeme vyjádřit pouze omezeně, protože počet účastníků je příliš nízký na to, aby umožňoval podrobnější analýzu. Nicméně i v našem souboru je patrné, že úspěšné laboratoře častěji využívají SP metodu, zatímco nejméně úspěšné spoléhají výhradně DP přístup. Na druhou stranu je vhodné SP metodu doporučit spíše zkušeným laboratořím, které s ní zacházejí rutinně a jsou schopny splnit zvýšené nároky na precizní přípravu vzorku.

ZÁVĚRY

Stanovení CD34+ buněk reprezentuje v rámci EHK velmi specifický program s malým počtem účastníků

a speciálně připravovanými vzorky, které vyžadují zvláštní péči v rámci logistických postupů. Přesto je jeho význam pro cílovou skupinu zejména hematologických nemocných poměrně zásadní. V současné době je program plně etablovaný, se stabilním počtem pravidelných účastníků, kteří vykazují vysokou míru úspěšnosti měření. Program přispívá k harmonizaci výsledků měření počtu CD34+ buněk. Správné měření CD34+ buněk patří mezi důležité indikátory kvality transplantčního centra a je zároveň předpokladem pro získávání přesných a porovnatelných multicentrických klinických dat.

LITERATURA

- Allan DS, Keeney M, Howson-Jan K, et al. Number of viable CD34+ cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2002;29:967-972.
- Gratama JW, Sutherland DR, Keeney M. Flow cytometric enumeration and immunophenotyping of hematopoietic stem and progenitor cells. *Semin Hematol* 2001;38:139-147.
- Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Masszi T, et al. Haematopoietic stem cell transplantation. *The EBMT Handbook*. 6. vyd. Janov, Forum service editore, 2012:93.
- Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *J Hemother* 1996;5:213-226.
- Gutensohn K, Carrero I, Krueger W, et al. Semi-automatic flow cytometric analysis of CD34 expressing hematopoietic cells in peripheral blood progenitor cell apheresis products. *Transfusion* 1999;39:1220-1226.
- Barnett D, Granger V, Kraan J, et al. Reduction of intra- and interlaboratory variation in CD34+ stem cell enumeration using stable test material, standard protocols and targeted training. *Br J Haematol* 2000;108:784-792.
- Dzik W, Sniecinski I, Fischer J. Toward standardization of CD34+ cell enumeration: An international study. *Transfusion* 1999;39:856-863.
- Gratama JW, Kraan J, Levering W, Van Bockstaele DR, Rijkers G, Van der Schoot CE. Analysis of variation in results of CD34^b hematopoietic progenitor cell enumeration in a multicenter study. *Cytometry* 1997;30:1091-1097.
- Barnett D, Granger V, Whitby L, et al. Absolute CD4+ T-lymphocyte and CD34+ stem cell counts by singleplatform flow cytometry: the way forward. *Br J Haematol* 1999;106:1059-1062.
- Eidenschink L, DiZerega G, Rodgers K, Bartlett M, Wells DA, Loken MR. Basal levels of CD34 positive cells in peripheral blood differ between individuals and are stable for 18 months. *Cytometry B Clin Cytom* 2012;82:18-25.
- Levering W, Preijers F, van Wieringen W, et al. Flow cytometric CD34+ stem cell enumeration: lessons from nine years' external quality assessment within the Benelux countries. *Cytometry Part B* 2007;72B:178-188.
- Gratama JW, Kraan J, Keeney M, Sutherland DR, Granger V, Barnett D. Validation of a single-platform ISHAGE method for CD34+ hematopoietic stem cell and progenitor cell enumeration in an international multicenter study. *Cytotherapy* 2003;5:55-65.

Podíl autorů na přípravě rukopisu

DL – příprava a finalizace rukopisu
 MB – statistická analýza, korekce rukopisu
 PJ, MH – revize rukopisu

Poděkování

Podpořeno projektem institucionálního výzkumu MZČR –FNPI, 00669806.

Čestné prohlášení

Autor práce prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou. Toto prohlášení se týká i všech spoluautorů.

Do redakce doručeno dne 9. 3. 2019.

Přijato po recenzi dne 15. 4. 2019.

doc. MUDr. Daniel Lysák, Ph.D.

Hematologicko-onkologické oddělení
 Fakultní nemocnice Plzeň
 Alej Svobody 80
 304 60 Plzeň
 e-mail: lysak@fnplzen.cz