



VALIDATION OF A FLOW-CYTOMETRY-BASED RED BLOOD CELL ANTIGEN PHENOTYPING METHOD

FLOW-SİTOMETRİ BAZLI ERİTROSİT ANTİJENİ FENOTİPLEME YÖNTEMİNİN VALİDASYONU

ALINTI: doi: <https://doi.org/10.1111/vox.13401>

YAZARLAR: Liwski R, Clarke G, Cheng C, Abidi SSR, Abidi SR, Quinn JG.

ÖZETLEYEN: Dr. Birol ŞAFAK

GİRİŞ

ABO olmayan antijenler için eritrosit (RBC) fenotiplemesi genellikle hem kan tedarikçileri hem de hastane bazlı kan transfüzyon merkezleri (TM) tarafından donör veya alıcı RBC'ler üzerinde gerçekleştirilir. Kanada'da bu, alloimmünizasyonun meydana gelme ihtimalinin yüksek olduğu klinik olarak önemli antijenleri (Rhesus D ve Kell) içerir. Diğer birçok RBC antijeninin de (D, C, c, E, e, K, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S ve s), transfüzyon yapılan bazı hastalarda alloimmünizasyona katkıda bulunduğu bilinmektedir.

Kan tedarikçilerinin ve hastanedeki transfüzyon merkezlerinin ilave antijenler için test yapma kararı değişkendir. Bazı hastaneler belirli klinik senaryolarda (pan-reaktif otoantikörleri olan hastalar veya orak hücre hastalığı), bazıları ise kronik olarak transfüzyon yapılan tüm hastalarda fenotip uyumlu kanın kullanımı yaklaşımını benimsemiştir.

Şu anda RBC fenotiplemesi, RBC aglütinasyonunun görsel olarak tespit edilmesine dayanan teknikler (jel kartlar veya katı faz plateler) kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemler, gözle görülür şekilde tespit edilebilir aglütinasyon oluşturmak için büyük miktarlarda hasta RBC'lerini, reaktif antiserumlarını ve antikörleri kullanır.

Flow sitometri klinik laboratuvarlarda hematopatolojide neoplastik hücre popülasyonlarını karakterize etmek ve bağışıklık yetersizliğinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılır. Ancak transfüzyon tıbbında kullanımı sınırlıdır. Laboratuvarlarda halihazırda yaygın olarak bulunması, flow sitometrinin transfüzyon tıbbında kullanım için potansiyel

oluşturur. Bu yöntemde serolojik yöntemlere kıyasla çok küçük miktarda reaktif kullanımı söz konusudur.

Bu araştırmanın amacı, hasta RBC örneklerinde alloimmünizasyonla en sık ilişkilendirilen yaygın RBC antijenleri için düşük maliyetli, yüksek verimli, düşük reaktif hacimleri kullanan flow sitometrisine dayalı RBC fenotipleme yöntemi geliştirmektir.

GEREÇ-YÖNTEM

Yetmiş örnek, hem flow sitometriye dayalı fenotipleme hem de manuel tüp standart aglütinasyon kullanılarak test edilmiştir.

Flow sitometri: Reaktifler ile birlikte %5'lik hasta RBC süspansiyonu kullanılmıştır. Antiserum kokteyli ve sekonder antikor kokteyli hazırlanmıştır. RBC fenotiplemesi 96 oyuklu U tabanlı Falcon mikropelatelerinde gerçekleştirilmiştir. FACSCanto II flow sitometre (BD Biosciences) kullanılmış ve veriler 1024 floresans kanal ölçeğinde BD FACSDIVA™ yazılımı (BD Biosciences) ile analiz edilmiştir. Tüm IgM antiserumları için, pozitif reaksiyonları sınıflandırmak amacıyla arka plan kontrolünden >100 MCFS (median channel fluorescence shift)'lik bir cut-off kullanılmıştır.

SONUÇ-TARTIŞMA

1. Flow sitometri yöntemi fenotip sonuçları, panel hücre çalışma sayfalarında bildirilen fenotip sonuçlarıyla ve hasta örnekleriyle yapılan geleneksel aglütinasyona dayalı testle %100 uyum göster.
2. Flow sitometriye dayalı yöntem, manuel tüp standart aglütinasyonu için gereken hacimlere (antijen başına 50 ul) kıyasla minimum reaktif hacmi (antijen başına 0,5-1 ul) kullanmıştır. Bu durum standart aglütinasyon testine göre kullanılan antiserum hacminde 50-100 kat azalmayı temsil eder.
3. Buna ek olarak, flow sitometri yöntemi çok hızlıdır (yaklaşık 30 dakika).

4. Ayrıca taze hazırlanmış ve bekletilmiş (7 gün +4°C'de saklanan) antiserum kokteyllerinin kullanılmasının sonuçlarda kayda değer bir fark oluşturmadığı görülmüştür.

Bu çalışmada hem geleneksel aglütinasyon bazlı fenotipleme yöntemi hem de RBC reaktif panel hücresi üreticileri tarafından sağlanan RBC fenotipleme sonuçları ile karşılaştırıldığında %100 uyum gösteren flow sitometri fenotipleme yönteminin başarılı bir şekilde doğrulandığı gösterilmiştir.

Rutin aglütinasyon bazlı RBC fenotiplemesi için kullanılan monoklonal IgM ve IgG bazlı antiserumların, floresan etiketli sekonder serumlarla birlikte kullanıldığında akış sitometrisinde başarıyla uygulanabileceği gösterilmiştir. Ayrıca flow sitometride küçük hacimde hasta hücreleri ve antiserumlar kullanılabilir ve birden fazla hasta numunesi aynı anda çalıştırılmaktadır.

Kapsamlı maliyet analizi bu makalenin kapsamı dışındadır. Ancak bu yöntemde kullanılması gereken reaktiflerdeki azalma göz önüne alındığında, yeterli test hacmine sahip merkezlere önemli maliyet avantajları sağlayabileceği sonucuna varılabilir.

Kan tedarikçileri tarafından yüksek oranda fenotiplenmiş bir alıcı popülasyonla birlikte sağlanan yüksek oranda fenotiplenmiş bir RBC bileşen envanterinin birçok potansiyel faydası vardır. Hastane kan merkezleri tarafında ise yüksek oranda fenotiplenmiş bir alıcı havuzuna sahip olmak, antikor geliştiren hastalarda daha hızlı antikor tanımlamasına ve uygun endikasyonu olan hastalar için RBC ünitelerinin daha çabuk teminine izin verecektir.

Bu yöntem fenotip eşleştirmenin daha geniş çapta kullanıldığı bir transfüzyon sistemine doğru ilk adım olabilir. Bu çalışmanın gelecekteki yönleri arasında; direkt antiglobulin testi (DAT) pozitif olan hastaların fenotipine yönelik flow sitometri kullanarak ek RBC antijenlerinin ve mevcut antiserumların çeşitliliğinin artırılması ve donör segmentlerinden RBC'lerin flow sitometrik RBC antijen fenotiplemesi yer almaktadır.

Bu tekniğin sınırlamaları, akış sitometrelerinin yalnızca orta veya büyük hastane kan merkezinde veya kan tedarikçilerinde bulunabilmesidir. Flow sitometre cihazı ve/veya ilgili uzman olmayabileceğinden, küçük bir hastanede uygulanması mümkün olmayacaktır. Maliyet verimliliği için kan merkezinin hastanenin başka bir bölümündeki cihazı kullanması veya yüksek test sayısı olan kan merkezlerinin cihaz satın alması gerekecektir.



Fenotip tespiti için düşük maliyetli, yüksek verimli yeni nesil dizileme (NGS) ve diğer prob bazlı genetik analizler kullanılarak RBC antijen genotiplenmesi hızla ortaya çıkan bir alandır. Bu teknikler test sayısının yüksek olduğu ve test için geri dönüş süresinin bir hastane transfüzyon hizmetinden daha az kritik olduğu kan tedarikçileri için en uygun olacaktır. Kan tedarikçisi tarafından NGS kullanılarak oluşturulan tam genotipli donör RBC envanteri, hastanede flow sitometrik RBC antijen tipleme kullanılarak transfüzyon öncesi hasta popülasyonu ile birleştirilebilir. Böylece donör ve alıcının tam fenotip eşleşmesine olanak sağlanacağından alloimmünizasyonda ve buna bağlı komplikasyonlarda azalma gerçekleşecektir.

Son olarak doğrudan konjuge antikorların geliştirilmesi, büyük kan merkezleri ve kan tedarikçileri için büyük sayılarda fenotiplemeye izin vereceğinden yaygın immünojenik antijenler için fenotiplenmiş RBC envanterlerine olanak tanıyacaktır. Bu durum transfüzyon tıbbında ileriye doğru büyük bir adımı temsil edecektir.

