

# FlowDiff: Bispebjergi ja Frederiksbergi haigla kogemuse tutvustus

**Inna Ruffati**  
laborimedit siini  
resident



**Karel Tomberg**  
arendusjuht  
Põhja-Eesti Regionaalhaigla  
laboratoorium  
ELMÜ juhatuse liige



Vererakkude manuaalne mikroskoopia on hemogrammi jätku-uuringu kuldne standard, kuid sellega võivad kaasneda mitmed probleemid nagu kogenud personali puudumine, pikaajalise väljaõppe vajadus, mikroskoopilise hindamise subjektiivsus ja raskused rakkude eristamisel. Neid probleeme proovitakse lahendada digitaalse mikroskoopia kasutuselevõtuga. Bispebjergi ja Frederiksbergi haigla (Kopenhaagen, Taani, edaspidi BFH) kliinilise keemia osakonna meeskond arendas ja võttis digitaalse mikroskoopia asemel kasutusele läbivoolutsütomeetria põhineva FlowDiffi meetodi. Laborimedit siini residentidel oli võimalus tutvuda selle uue ja huvitava lahendusega tänu kliinilise keemia laboriarstile dr Konstantinos Dimopoulosele.

## Kui palju jätku-uuringuid tehakse BFH-s?

Tavaliselt vajavad 10–20% hemogrammidest verepildi hindamist automaatanalüsaatori tulemuste täpsustamiseks<sup>1</sup>. Suure töökoormuse, tööjõupuuduse ja märkimisväärtete tööjõukulude tõttu alustas labor automaatanalüsaatori Sysmex XN-1000 vahevara eIPU reeglite muutmise ja verifitseerimisega. Ajakuluka ja suuremahulise töö lõpuks redutseeriti olulisel määral eIPU reegleid ja tõsteti Q-flag lävendeid (automaatanalüsaatori lävend kommentaari väljastamiseks). eIPU reeglitega, mille alusel tehakse praegusel hetkel hemogrammi jätku-uuringuid BFH-s, saab tutvuda

tabelis 1. Võrdluseks, PERH-i laboris on 78 eIPU reeglit ja kõik Q-flag lävendid on 100, mis on kooskõlas tootja soovistustega.

Päevas tehakse BFH-s keskmiselt 10–15 FlowDiffi analüüsi ca 360 hemogrammist, PERH-is keskmiselt 80 vereäige mikroskoopiat ca 650 hemogrammist.

## Kuidas toimub vererakkude analüüs FlowDiffi meetodiga?

Läbivoolutsütomeetria uuringuks olid valitud Sysmexi seadmed, kuna neid on võimalik liidestada eIPU-ga ja info liigub automaatselt hemogrammi ja läbivoolutsütomeetria seadmete vahel.

Tabel 1. eIPU reeglid, mille alusel tehakse hemogrammi jätku-uuringuid Bispebjergi ja Frederiksbergi haiglas.

| Reeglid:                                       |
|------------------------------------------------|
| Lümfotsütoos > 5 x 10 <sup>9</sup> /L          |
| Monotsütoos > 3 x 10 <sup>9</sup> /L või > 20% |
| IG > 10%                                       |
| PLT clumps, kui PLT < 100 x 10 <sup>9</sup> /L |
| Blasts? (Q-flag alates 160)                    |
| Abnormal lymphocytes? (Q-flag alates 170)      |
| Atypical lymphocytes? (Q-flag alates 120)      |
| Left shift? (Q-flag 300)                       |
| Fragments?                                     |



Artikli autorid FlowDiff tarkvaraga tutvumas. Vasakult Konstantinos Dimopoulos, Inna Ruffati, Evelina Gramann, Karel Tomberg, Liisi Võsa, Ingrid Hein. Pildi tegi arst-resident Anne Must.

BFH-s valideeriti tootja soovitus-test erinev, kuid aega säästvam proovide ettevalmistamise protsess Sysmex PS-10 seadmel: *stain-lyse-no wash* protokoll. Proovi inkubeeritakse antikehadega valguse eest kaitstult 15 minutit. Seejärel erütrotsüüdid lüüsitakse, kasutades CyLyse LV puhvrit, ja inkubeeritakse veel kord 10 minutit. Pesemist ei toimu. Kokku kulub proovide ettevalmistamiseks umbes 30 minutit.

Leukotsüütide analüüs toimub Sysmex XF-1600 seadme abil. Analüüsiks kogutakse 50 000 leukotsüüti ja edasi jaotatakse rakud vastavalt markerite ekspressioonile. Selleks võeti kasutusele 8 CyFlow antikehaga (Sysmex) paneel. Antikehade segu valmistatakse laboris käsitsi. Rakkude populatsioonid ja antikehad, mis neid tuvastavad, on toodud tabelis 2<sup>1</sup>.

Tabel 2. FlowDiff uuringus kasutatavad antikehad ja nende poolt tuvastatavad rakkude populatsioonid.

| Antikeha | Populatsioon                     |
|----------|----------------------------------|
| CD5      | T-rakud, CD5+ lümfoomid (nt KLL) |
| CD14     | Monotsüüdid                      |
| CD16     | Küpsed neutrofiilid, NK-rakud    |
| CD19     | B-rakud, k.a B-lümfoomid         |
| CD34     | Blastid                          |
| CD45     | Leukotsüüdid                     |
| CD117    | Blastid, promüelotsüüdid         |
| CD123    | Basofiilid                       |

Järgmisena toimub rakkude populatsioonide piiritlemine voolutsütomeetria tarkvaras bioanalüütiku poolt. FlowDiffi tulemuste ümberarvutamine

toimub vastavalt patsiendi leukotsüütide arvule automaatselt. Vastusena väljastatakse ainult FlowDiffi tulemus ja lisatakse vastav kommentaar.

### Milliseid haigusi on võimalik FlowDiffiga avastada?

BFH-s ei ole statsionaarset hematoloogiaosakonda. Seetõttu on FlowDiff suunatud võimalike esmaste vereloomehaiguste tuvastamiseks.

BFH labor ei väljasta blastide tulemust, kui see jääb < 5% kogu leukotsüütide populatsioonist. Võrdluseks, regionaalhaigla laboris väljastatakse mistahes blastide tulemus ning on esinenud ägedaid leukeemiaid ka < 5% blastide osakaalu korral. Dimopouluse andmetel ei ole nad veel ühtegi ägedat leukeemiat avastamata jätnud. Ühtlasi võimaldab FlowDiffi meetod eristada lümfoideid

blaste müeloidsetest blastidest, mis mikroskopeerimisel pole alati võimalik, nt CD19+ blastid B-ALL korral.

Eraldi populatsioonina eristatakse ka CD5+ B-rakke (CD5+CD19+ raku-populatsioon), mis esinevad nt mantel-rakklümfoomi ja kroonilise lümfootsüit-leukeemia (KLL) korral (vt joonis 1). KLL on sagedasem täiskasvanute leukeemia lääneriikides<sup>2</sup>. FlowDiffi meetod annab võimaluse varakult leida CD5+ B-rakkudega seotud haigusi ja jälgida ravivastust.

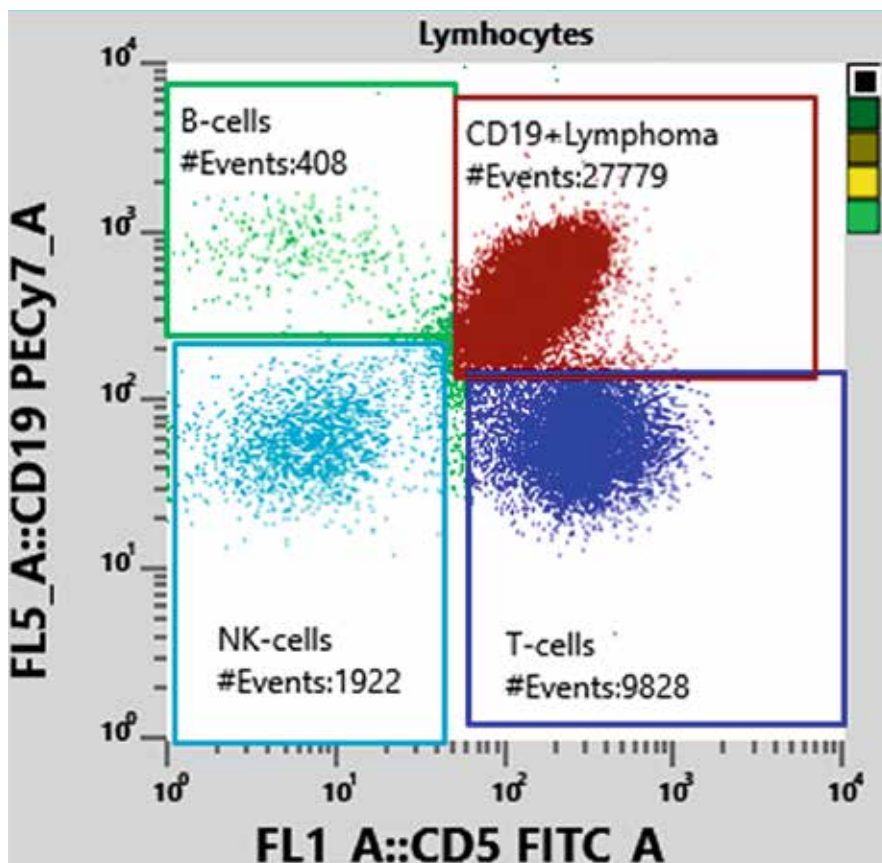
Teisi B-rakulisi neoplaasiaid kahtlustatakse B-lümfootsütoosi esinemisel ehk kui B- ja T-rakkude suhe on > 2. Probleemiks võib osutada atüüpiliste lümfootsüütide avastamine lümfopeenias korral või viirusinfektsiooni foonil, kuid ka mikroskoopiat kasutades ei ole alati võimalik eristada atüüpilisi lümfootsüüte normaalsetest lümfootsüütidest.

### Mida ei ole võimalik FlowDiffiga avastada?

Kuigi FlowDiffi lahendusega saab eristada reaktiivseid lümfootsüüte teatud tüüpi B-rakulistest vereloome kasvaja-test, ei ole reaktiivsete lümfootsüütide eristamine T-rakulistest neoplaasiatest võimalik. Dimopoulouse sõnul annab vihje T-rakulistele proliferatsioonidele persisteeriv T-rakuline lümfootsütoos.

Ei ole võimalik leida ka plasmarakke, mis lähevad ebaküpsete granulotsüütide (IG) või blastide populatsiooni hulka.

Samuti ei erista FlowDiffi meetod segmenttuumseid neutrofiile kepptuumsetest neutrofiilidest. See on kooskõlas rahvusvahelise soovitusel<sup>3</sup>. Promüelotsüüte, müelotsüüte ja metamüelotsüüte väljastatakse FlowDiffis IG populatsioonina. Dimopoulouse arvates ei ole nii kepptuumsete neutrofiilide



Joonis 1. Näide FlowDiffi meetodil leitud CD5+ lümfoomist (kinnitus KLL). Joonisel on näha tumepunane CD5+ ja CD19+ populatsioon, mis viitab CD5+ lümfoomile.

kui ebaküpsete granulotsüütide eristamisel kliinilist tähendust.

Müelodüsplastiliste muutuste tuvastamine ei ole samuti võimalik. Dimopoulos arvab, et düsplastiliste muutuste eristamine hemogrammi jätku-uuringus ei ole vajalik, kuna need muutused on mittespetsiifilised ja esinevad ka teiste haiguste korral, nt viirusinfektsioonid, autoimmuunsed haigused, krooniline alkoholi kuritarvitamine jt<sup>4</sup>. Tema sõnul on müelodüsplastiline sündroom hematopatoloogiline diagnoos ja iga seletamatu tsütopeenia vajab nagunii edasist suunamist hematoloogi vastuvõtule.

Läbivoolutsütomeetria ei ole sobilik trombotsüütide ja erütrotsüütide morfoloogia hindamiseks ning ei võimalda ka parasiitide leidmist. BFH-s teostatakse parasiitide uuringuid kliinilise mikrobioloogia osakonnas. Erütrotsüütide fragmente vaatab hematoloog kõrgema etapi haiglas CellaVision digitaalse mikroskoopia platvormi abil. Huvitav on ka asjaolu, et Taanis ei ole erütrotsütaarse morfoloogia hindamine tavapärane. Trombotsüütide agregaatide hindab bioanalüütik valgusmikroskoopia abil.

### Mis oleks FlowDiffi kasutusele võtmisel hea?

Kuigi manuaalne mikroskoopia on n-ö kuldne standard, ei ole tavalist valgusmikroskoopi kasutades alati võimalik määrata, kas rakk on pahaloomuline või mitte. Mõningate haiguste korral, nt KLL, annaks FlowDiffi meetod võimaluse uuringu käigus kohe leida pahaloomulisi rakke.



Kuigi manuaalne mikroskoopia on n-ö kuldne standard, ei ole tavalist valgusmikroskoopi kasutades alati võimalik määrata, kas rakk on pahaloomuline või mitte.

Teine eelis on lihtsam ja kiirem väljaõpe. Mikroskoopia väljaõpe on aeganõudev ja võtab tavaliselt kuni üks aasta. Hetkel on probleemiks saamas personali nappus ja ebapiisav uute spetsialistide juurdekasv. FlowDiffi väljaõpe BFH-s kestab aga ühe kuu.

Tavaliselt piirab läbivoolutsütomeetria kasutamist analüüsi kõrge hind. Dimopoulouse sõnul on ühe FlowDiffi analüüsi kulu 14 eurot pluss tööjõukulu.

### Millised probleemid võivad esineda FlowDiffi kasutamisel?

Hematoloogilise automaatanalüsaatori tootjapoolsete reeglite ja lipukeste muutmine vajab väga põhjalikku valideerimist, et tagada patsiendi ohutus ja piisav sensitiivsus haiguste leidmiseks.

Meie arvates ei ole täielik loobumine mikroskoopiast võimalik. Trombotsüütide agregaatide, veres leiduvate parasüütide olemasolu ja erütrotsüütide morfoloogia hindamiseks on vajalik mikroskoopia, kuna läbivoolutsütomeetria kasutamine selleks ei sobi.

Tuleb meeles pidada ka asjaolu, et BFH-s ei ole statsionaarset hematoloogiasakonda. Mõned lahendused, mis sobivad selle haigla kontekstis, nt blastide väljastamine, kui populatsiooni suurus on üle 5%, ei pruugi olla piisavad statsionaarse hematoloogiasakonnaga haiglates, kus on vajalik pidev patsiendi jälgimine ja ravivastuse hindamine. Eri-nevalt mikroskoopiast avastab Flow-



Sysmex PS-10 seade, mis valmistab ette proove voolutsütomeetriaks.



Mikroskoopia väljaõpe on aeganõudev ja võtab tavaliselt kuni üks aasta. Hetkel on probleemiks saamas personali nappus ja ebapiisav uute spetsialistide juurdekasv.

Diff ainult teatud tüüpi ja suuri muutusi veres. Seetõttu on vereloomehaiguse kahtlusel täiendavad uuringud igal juhul näidustatud.

Vajalik on ka arusaam, et FlowDiff ei asenda hematopatoloogilist uuringut ja konventsionaalset läbivoolutsütomeetria hematoloogilise haiguse diagnoosimisel, vaid annab teise valiku hemogrammi jätku-uuringuks või lisavõimaluse mikroskoopia kõrval.

Kokkuvõtteks on FlowDiff uus ja huvipakkuv lahendus automaatse

hemogrammi jätku-uuringuna. Nii nagu kõikidel teistel laboriuuringutel, on ka sellel meetodil omad head küljed ja puudujäägid. Enne uue meetodi kasutuselevõttu peab iga labor otsustama, milline tööprotsess sobib kõige paremini nende labori kontekstis, ja alati tuleb mõelda ka patsiendi ohutusele.

*Autorid avaldavad tänu dr Kärt Tombergile artikli käsikirja toimetamise eest.*

### Kasutatud kirjandus

1. Dimopoulos, K., Bonneau, D., Hannibal, J. FlowDiff: a simple, flow cytometry-based approach for performing a leukocyte differential count. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2024;84(7-8):493-501. doi: 10.1080/00365513.2024.2426140.
2. Sander, B., Campo, E., Hsi ED. Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma and mantle cell lymphoma: from early lesions to transformation. *Virchows Arch.* 2023;482(1):131-145. doi: 10.1007/s00428-022-03460-y.
3. Palmer, L., Briggs, C., McFadden, S., Zini, G., Burthorn, J., Rozenberg, G., Proytcheva, M., Machin, S. J. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2015; 37:287-303. doi: 10.1111/ijlh.12327.
4. Bejar, R. Myelodysplastic Syndromes Diagnosis: What Is the Role of Molecular Testing? *Curr Hematol Malign Rep.* 2015;10(3):282-91. doi: 10.1007/s11899-015-0270-5.



Sysmex XF-1600 voolutsütomeeter.