

INDAGINE SULL’AFFIDABILITÀ DELLA CONTA CELLULARE

A. Di Stefano, R. Cristantielli, N. Perciballi, R. Bugianesi, M. Gunetti



Ospedale Pediatrico Bambino Gesù - Roma

INTRODUZIONE

L’accurata valutazione del numero di cellule e/o della densità cellulare di una sospensione cellulare è prerequisito fondamentale per l’allestimento e la buona riuscita di saggi e test biologici quali test di potency ed esperimenti quantitativi quali la qPCR. Nell’ambito del Controllo di Qualità di prodotti farmaceutici per terapia avanzata, la conta cellulare è alla base di test volti alla determinazione di parametri necessari alla caratterizzazione ed alla valutazione della sicurezza d’uso del prodotto finito. È quindi necessario verificare l’affidabilità delle diverse metodiche di conta cellulare per supportare l’attendibilità dei parametri da essa derivati. La conta cellulare può essere eseguita con diversi metodi, manuali o strumentali. In questo lavoro alcune delle metodiche correntemente eseguite nei laboratori di Controllo Qualità presso l’Officina Farmaceutica dell’Ospedale Pediatrico Bambino Gesù sono state comparate al fine di valutarne la validità mediante un confronto in termini di precisione e differenza percentuale tra i risultati ottenuti.

MATERIALI e METODI

Sono state analizzate 2 linee cellulari, una in sospensione (KARPAS) ed una in adesione (SHSY5Y) ed una sospensione di cellule CAR-T (drug product per terapia genica). Ciascuna delle tre tipologie di colture cellulari è stata analizzata tal quale (indiluita) e diluita secondo due fattori di diluizione, ovvero 1:2 ed 1:10. Ciascuna delle tre tipologie di colture cellulari alle tre diverse concentrazioni sono state contate con il metodo tradizionale al microscopio, ovvero il metodo manuale con Trypan Blue, e con due diversi metodi strumentali di citofluorimetria a flusso, ciascuno condotto su una diversa strumentazione e basato su diversi principi:

- 1) conta su FACSCanto II BD, in cui le cellule vengono contate rispetto ad un numero noto di biglie fluorescenti presenti nel tubo Trucount e rilasciate con l’aggiunta della sospensione cellulare
- 2) conta su MACSQuant 10 Miltenyi, in cui si ha una conta cellulare volumetrica assoluta.

Le conte sono state effettuate in triplicato per ciascuna coltura cellulare, per ciascun fattore di diluizione (1, 1:2 e 1:10) e per ciascuna metodica adottata, secondo lo schema seguente:

Metodo	Trypan Blue									Trucount									MACSQuant								
	KARPAS			SHSY5Y			CAR-T			KARPAS			SHSY5Y			CAR-T			KARPAS			SHSY5Y			CAR-T		
Fattore diluizione	1	0,5	0,1	1	0,5	0,1	1	0,5	0,1	1	0,5	0,1	1	0,5	0,1	1	0,5	0,1	1	0,5	0,1	1	0,5	0,1	1	0,5	0,1
Replicati	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

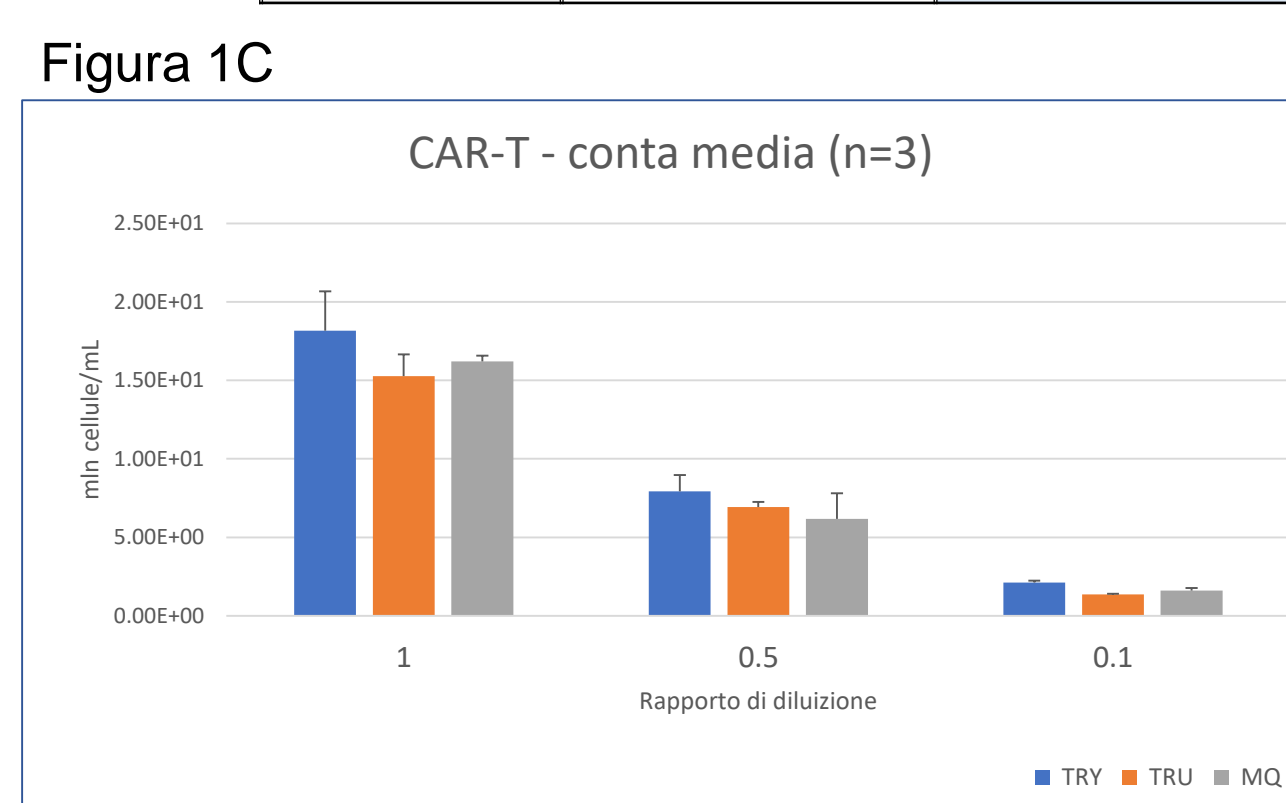
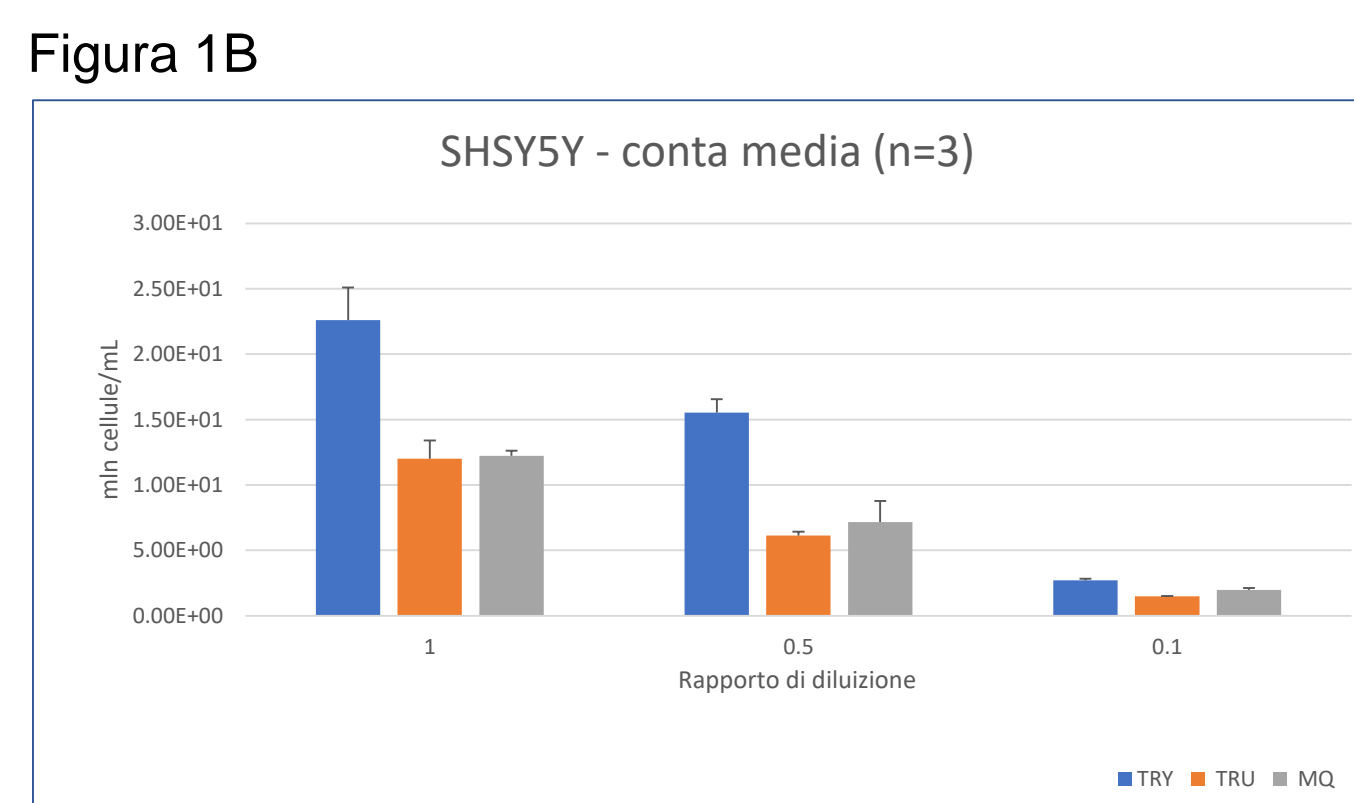
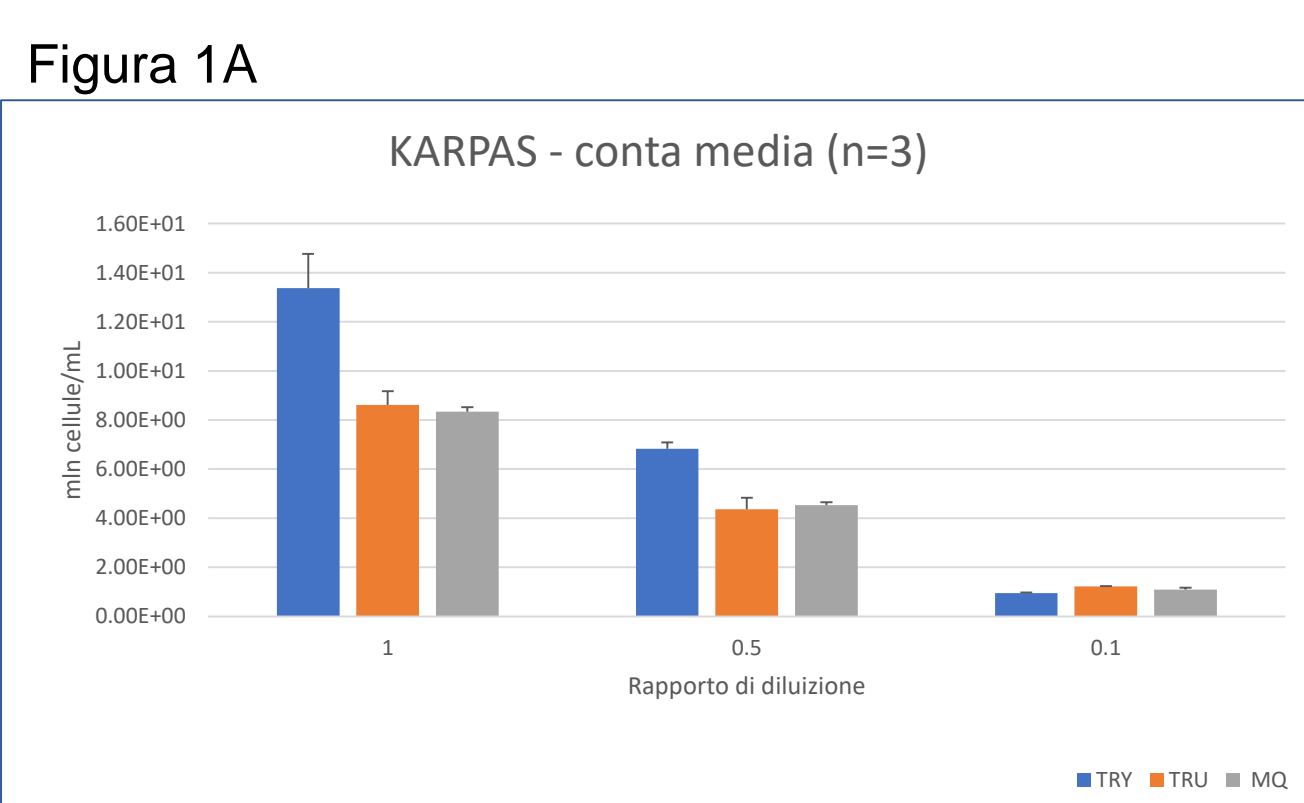
RISULTATI

Nell’ambito di ciascuna metodica di conta e per ciascuna diluizione delle colture cellulari, si osserva un coefficiente di variazione tra i triplicati sempre $\leq 12\%$, con una sola osservazione al MACSQuant pari al 23% e relativa alla linea cellulare SHSY5Y diluita 1:2. Ad eccezione di questo dato, la metodologia MACSQuant si mostra più precisa, con coefficienti di variazione sempre inferiori al 10%, nel range 2-9% (Tabella 1; Figure 1A, 1B ed 1C).

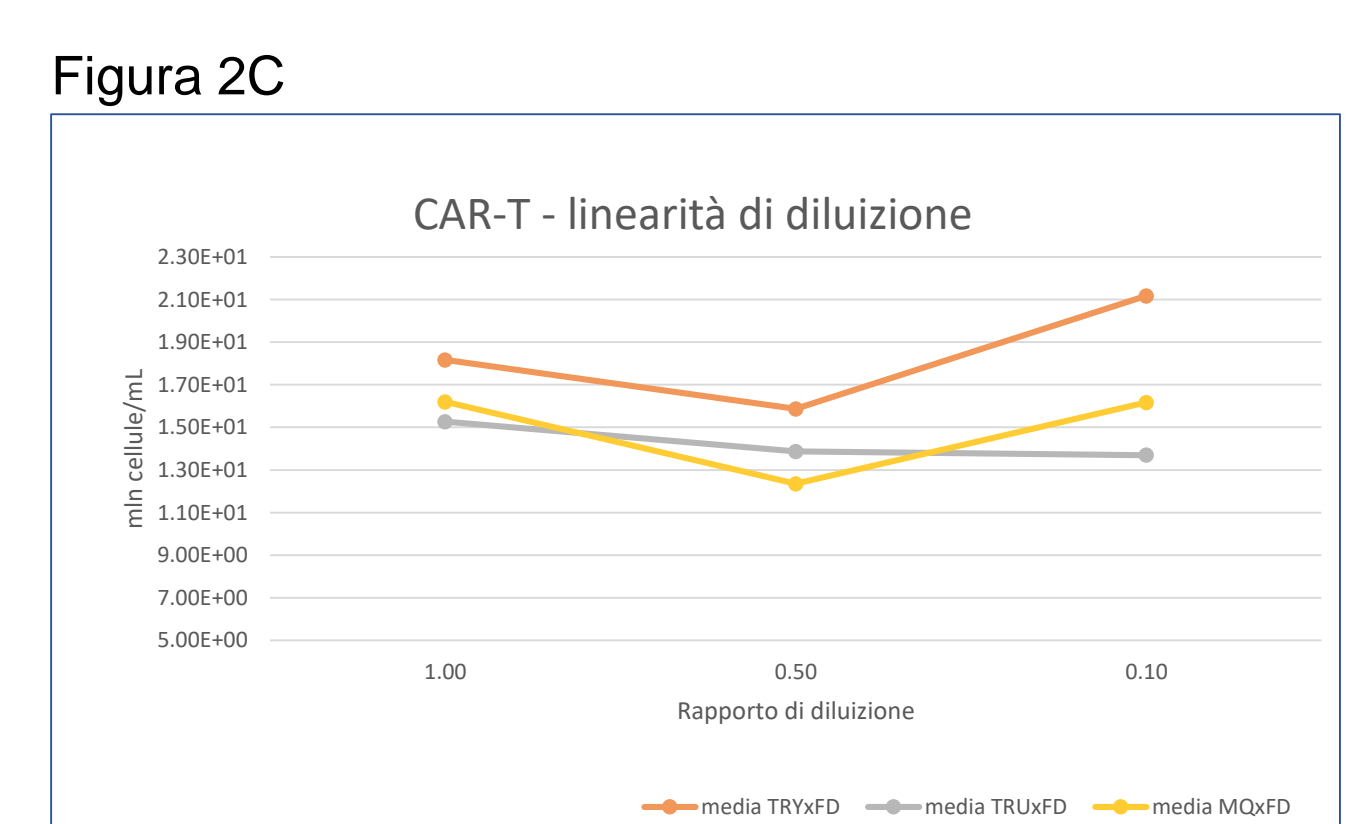
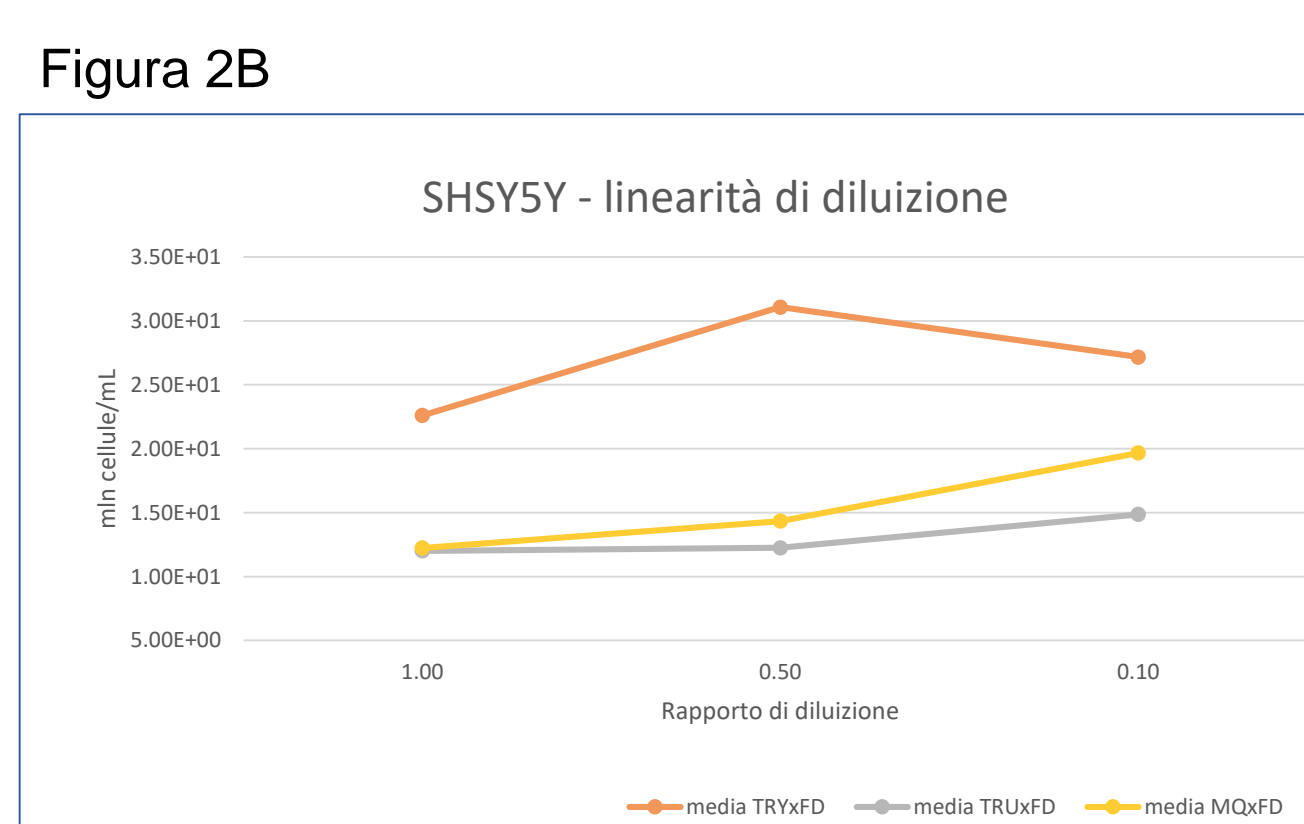
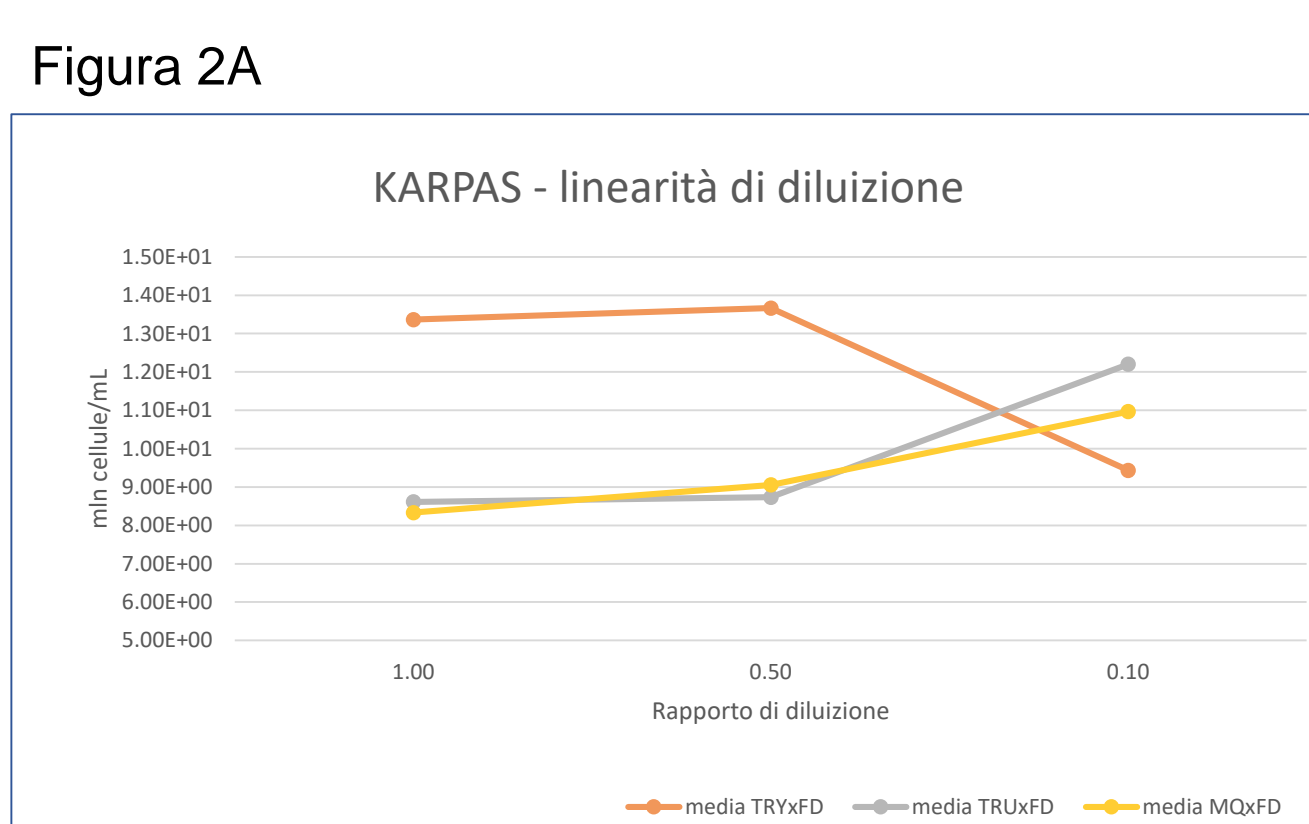
In ciascuna delle condizioni analizzate rispetto ai diversi metodi applicati a ciascuna linea cellulare, si osserva un risultato coerente con il fattore di diluizione e costantemente associato ad una bassa variabilità (Figure 1A, 1B ed 1C).

Tabella 1

Coltura cellulare	Fattore di diluizione	CV% TRY	CV% TRU	CV% MQ
KARPAS	1	10	6	2
	0.5	4	11	3
	0.1	4	2	6
SHSY5Y	1	11	12	3
	0.5	7	5	23
	0.1	5	2	8
CAR	1	1	4	9
	0.5	5	11	8
	0.1	5	6	5



Dall’osservazione degli andamenti ottenuti dalla media della conta moltiplicata per il fattore di diluizione in funzione del fattore di diluizione stesso (FD), è possibile apprezzare delle differenze sostanziali tra i metodi di conta applicati. Il metodo al microscopio con Trypan Blue mostra infatti di sovrastimare la conta di tutte e tre le colture cellulari soprattutto nelle colture indiluite e nella diluizione più bassa (1:2). I due metodi strumentali invece, rilasciano valori di conta sempre paragonabili tra loro. Alla diluizione più alta (1:10) i valori di conta al microscopio mostrano tendenzialmente una riconciliazione con le conte strumentali (Figure 2A, 2B e 2C).



CONCLUSIONI

- I metodi di conta strumentale si mostrano maggiormente riproducibili rispetto al metodo al microscopio sia per le colture cellulari in sospensione che in adesione;
- I metodi di conta strumentale mostrano una sostanziale coerenza tra loro;
- Il metodo al microscopio tende a sovrastimare la conta soprattutto in condizioni di maggiore densità cellulare nel range indiluito-diluito 1:10;
- Nel caso delle colture KARPAS e SHSY5Y, a densità cellulari più basse nell’ambito del range di diluizione testato, si osserva un maggiore accordo tra le conte strumentali e quella al microscopio ad una densità cellulare intorno a 1 mln cellule/mL. Tale convergenza è derivata sia da una lettura più bassa al microscopio che da un aumento della conta strumentale. Su base puramente ipotetica, è possibile speculare che i tre metodi diventino più accurati per densità cellulari inferiori.