

Index

	Page
Summary	1
Background	3
Methods and materials	7
Results	9
Discussion	13
Appendix 1	
Appendix 2	
Appendix 3	

Comparison of two methods for evaluation of tumour mass in multiple myeloma

Summary

Background: The size of malignant tumours are in many instances proven or thought to mirror the risk of progression and/or death. In multiple myeloma, tumour cell mass can not be directly measured as the cells do not adhere to each other and are not in a single location. Instead, plasma cell number in bone marrow is used as a surrogate. The aim of this study was to compare, and evaluate prognostic value of two measurements of multiple myeloma cell number: The percentage of plasma cells on smear or biopsy and the number of CD138 positive plasma cells per ml bone marrow.

Method: The data were extracted from the Norwegian biobank for multiple myeloma. Spearman rank correlation method was used to evaluate the correlation between the two methods, whilst Cox survival analyses were used to evaluate their prognostic value.

Results: Spearman's $r=0.457$, significant at the 0.01 level (2-tailed test). Cox survival analyses on progress free survival and overall survival with or without correction for ISS score and cytogenetic abnormalities gave and $\text{Exp}(B) = 1.000$ to 1.001 for CD138 positive cell count and 0.980 to 1.027 for percentage of plasma cells on bone marrow smear.

Conclusion: The two multiple myeloma cell count methods are weakly correlated and neither give information on risk of progression or death.

Background

The size of malignant tumours have been explored as and found to be a prognostic factor, e.g. osteosarcoma, vulvar(1) and anal(2) cancer. However, this issue is more complex than it first appears. It can be difficult to determine the size of tumours, especially deep within the body. It is also a question of which measurement to use: The depth of for instance a skin tumour by biopsy, the volume determined by MRI or the cross sections on CT? Obviously, the method must be adapted to the cancer in question. Other characteristics than size may affect the prognosis, e.g. its likelihood of invading other structures and occupation of space. Many of

these aspects are reflected in the TNM staging of malignant disease. Assessment of tumour mass in haematological diseases requires other approaches like cell counts in blood, percentage of malignant cells in bone marrow, evaluation of infiltration of malignant cells in bone marrow fragments etc. In general, these methods are indirect and inaccurate.

Panel Revised International Myeloma Working Group diagnostic criteria for multiple myeloma and smouldering multiple myeloma

Definition of multiple myeloma

Clonal bone marrow plasma cells $\geq 10\%$ or biopsy-proven bony or extramedullary plasmacytoma*

* Clonality should be established by showing κ/λ -light-chain restriction on flow cytometry, immunohistochemistry, or immunofluorescence. Bone marrow plasma cell percentage should preferably be estimated from a core biopsy specimen; in case of a disparity between the aspirate and core biopsy, the highest value should be used. and any one or more of the following myeloma defining events:

- Myeloma defining events:
 - Evidence of end organ damage that can be attributed to the underlying plasma cell proliferative disorder, specifically:
 - Hypercalcaemia: serum calcium $>0.25 \text{ mmol/L} (>1 \text{ mg/dL})$ higher than the upper limit of normal or $>2.75 \text{ mmol/L} (>11 \text{ mg/dL})$
 - Renal insufficiency: creatinine clearance $<40 \text{ mL per min}^{\dagger}$

[†] Measured or estimated by validated equations.
or serum creatinine $>177 \mu\text{mol/L} (>2 \text{ mg/dL})$

- Anaemia: haemoglobin value of $>20 \text{ g/L}$ below the lower limit of normal, or a haemoglobin value $<100 \text{ g/L}$
- Bone lesions: one or more osteolytic lesions on skeletal radiography, CT, or PET-CT[‡]

[‡] If bone marrow has less than 10% clonal plasma cells, more than one bone lesion is required to distinguish from solitary plasmacytoma with minimal marrow involvement.

- Any one or more of the following biomarkers of malignancy:
 - Clonal bone marrow plasma cell percentage* $\geq 60\%$
 - Involved/uninvolved serum free light chain ratio[§]

[§] These values are based on the serum Freelite assay (The Binding Site Group, Birmingham, UK). The involved free light chain must be $\geq 100 \text{ mg/L}$.
 ≥ 100
• >1 focal lesions on MRI studies[¶]

[¶] Each focal lesion must be 5 mm or more in size.

Definition of smouldering multiple myeloma

Both criteria must be met:

- Serum monoclonal protein (IgG or IgA) $\geq 30 \text{ g/L}$ or urinary monoclonal protein $\geq 500 \text{ mg per 24 h}$ and/or clonal bone marrow plasma cells 10–60%
- Absence of myeloma defining events or amyloidosis

PET-CT=¹⁸F-fluorodeoxyglucose PET with CT.

Multiple myeloma is a cancer of plasma cells. The clonal proliferation of plasma cells in the bone marrow can lead to displacement of other blood cells, increased production of monoclonal immunoglobulin and damage to other parts of the body, e.g. kidney failure. To diagnose multiple myeloma, the clinician evaluates the monoclonal immunoglobulin in blood and urine and the fraction (%) of plasma cells

in the bone marrow on smears or biopsies according to international guidelines(3).

The question of tumour size and its significance is especially difficult for multiple myeloma, as it is not a solid tumour. The cells are not adhesive to one another, can grow in various parts of the bone marrow and, as the disease progresses, in other parts of the body as well.

The standard method for evaluating the amount of plasma cells in the bone marrow today is manual counting with the use of a light microscope. The fraction (%) of myeloma cells in smears from a single puncture site is usually used. Biopsies are also used, and will systematically provide higher fraction of plasma cells due to dilution with blood in aspirates. For both methods, a very small part of the total bone marrow is evaluated. It is generally agreed that the precision of these methods is poor.

CD138 is a cell surface marker found on epithelial and mesenchymal cells, carcinoma cells, and on healthy and malignant plasma cell. A subgroup of malignant plasma cells do not exhibit CD138(4, 5). However, these do not seem to contribute to disease(6). In vitro shedding of CD138 when there is a delay in analysis leads to non-detection of previously viable plasma cells(7). CD138 is a sensitive and specific marker of plasma cells (8) if samples are promptly analysed. It has been widely used for immunostaining in pathological specimens as well as for isolation of plasma cells from bone marrow aspirates.

One study in patients receiving autologous stem cell transplantation found that the fraction of plasma cells in the bone marrow by use of light microscopy was prognostic(9). However, inter-observer variability for such counts is considerable. For research, the use of CD138 antibodies and automatic counting is now frequently used. This method also uses bone marrow from a single puncture site. A study by Al-Queran et al. showed that the inter-observer variability for plasma cell percentages was reduced when CD138 antibody staining of the smears was used(10). It is not known whether the use of CD138 positive antibodies and automatic counting can improve the reliability and validity of plasma cell load in the bone marrow. However, automatic counting allows for larger quanta of bone marrow to be evaluated at a time.

Whilst CD138 positive plasma cell counts have not been shown to be prognostic, soluble CD138, syndecan-1, in plasma has(9, 11).

The aim of this study was to see if the two methods yield similar results and whether either one can give useful prognostic information.

The following questions were the basis of our study:

1. Does the CD138 positive cell counts in aspirate correlate with the percentage of plasma cells obtained from light microscopy of the bone marrow smear?
2. Is there a correlation between plasma cell counts/percentage and progression free survival (PFS) and overall survival (OS)?

Inclusion of patients

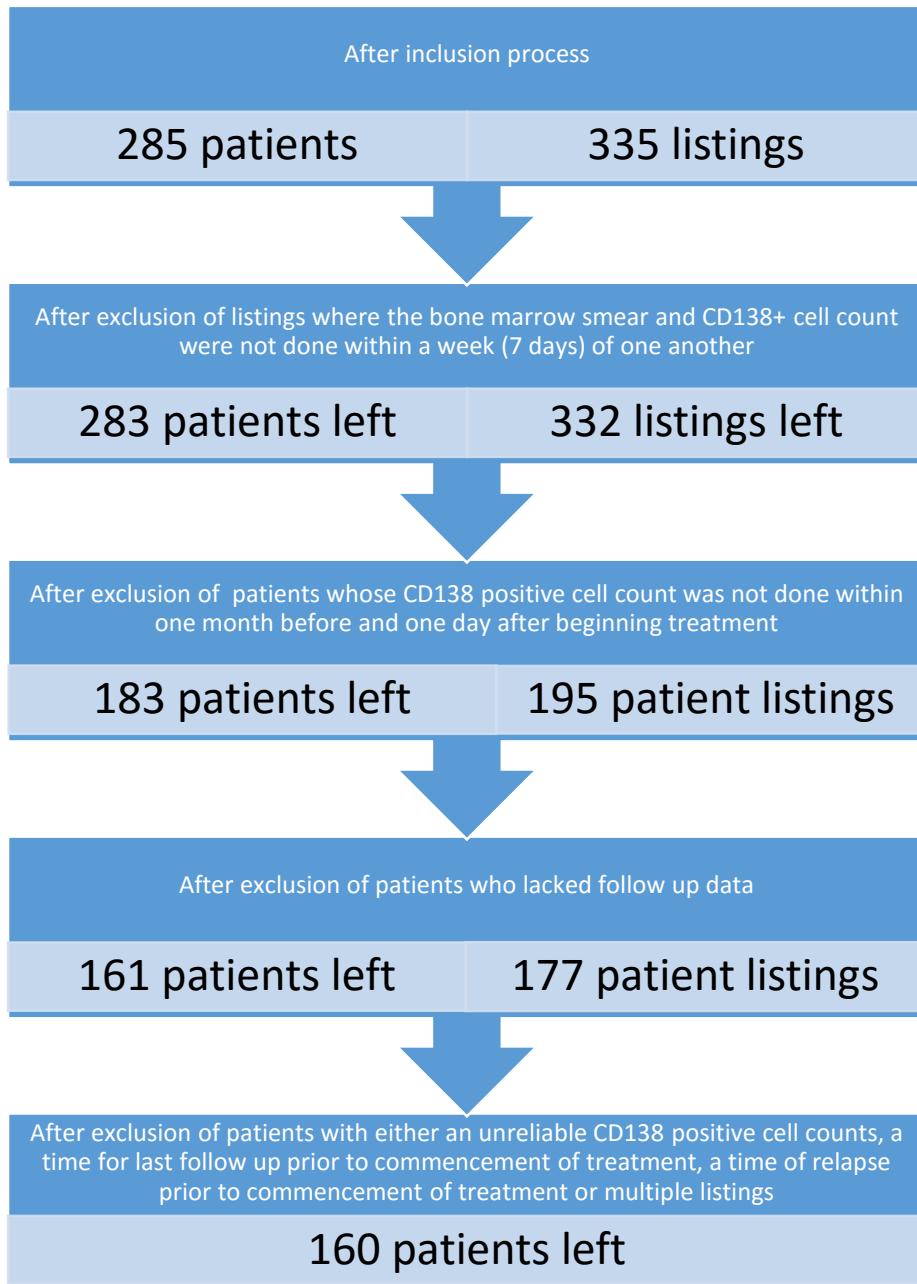
All patients in the Norwegian biobank for multiple myeloma registered from 2008 until July 9th 2015 in whom a CD138 positive cell count had been obtained, were included in the study if they:

- Were registered with a diagnosis of multiple myeloma
- Had a CD138 positive cell count and
- A plasma cell percentage from a smear

Exclusion of patients

Patients were excluded from the correlation analysis if the CD138 positive cell count and the smear had been taken more than 7 days apart. If patients had more than one listing, a test taken before diagnosis was preferred. If none was available, the test done as close to diagnosis as possible was used. Any further listings were excluded.

As to the question of CD138 positive cell count and bone marrow smear/aspirate's prognostic value, patients were excluded as described below:



In some of the Cox analyses, SPSS left out some patients due to missing data for progression free survival, cytogenetic abnormalities and/or ISS score. For details, consult appendix 3.

Methods and material

Patients

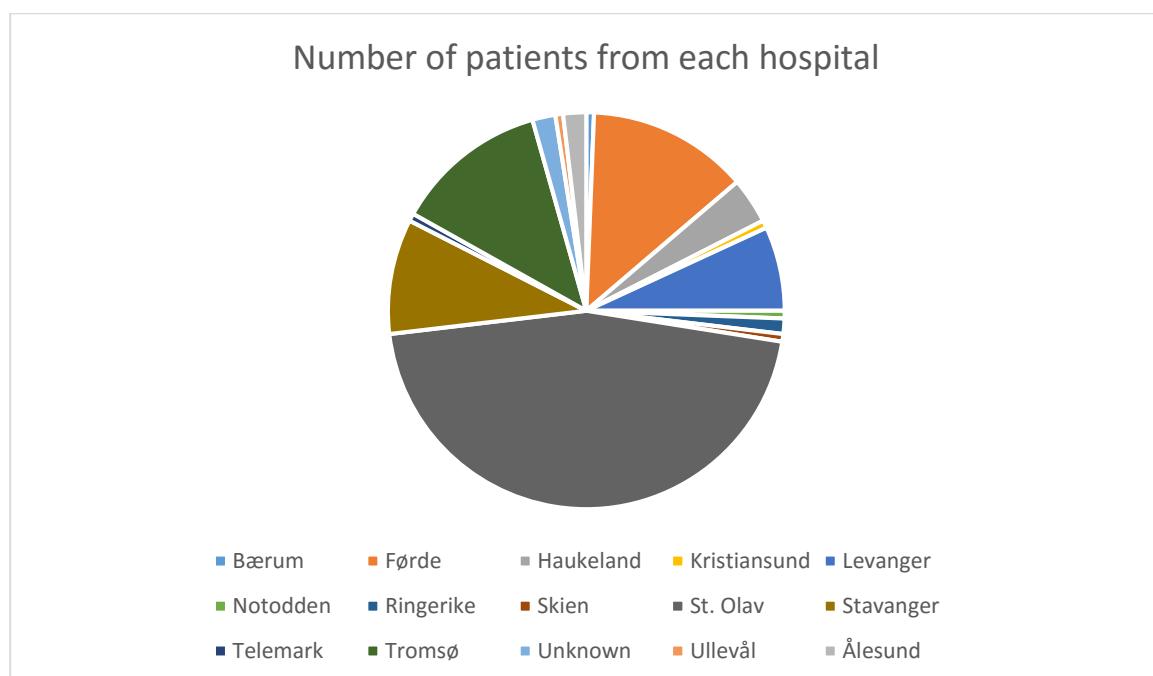
Patients gave their written consent for their biological materials and clinical records to be used in research upon entry into the biobank. The Regional Ethics Committee deemed additional consent for this study unnecessary (REK 2015/912).

Data collection

The CD138 positive cell counts were taken from stored information from bead based isolation of cells (RoboSep™) by the bioengineers. The mean amount of bone marrow analysed was 15,69 ml (range 3-50 ml). The full isolation and counting procedure is reproduced in Norwegian in Appendix 1.

The plasma cell percentage in bone marrow smears were sought in the biobank's electronic database or in the patient's records. The patients' gender, age, date of diagnosis, start-up date of first treatment, date of relapse, time of death, time of last follow up, ISS score and cytogenetic abnormalities (t(4;14) and del17p) were taken from the biobank electronic database or the patient's records.

46% of bone marrow specimens were from St. Olavs hospital. The remaining patients were registered from 13 other hospitals. Clinical data from Tromsø, Førde and for some patients in Central Norway were collected from the patient records by a visit to the hospitals. For the other patients, data were collected from the biobank registry.



Statistics

Does the CD138 positive cell counts in aspirate correlate with the percentage of plasma cells obtained from light microscopy of the bone marrow smear?

Spearman rank correlation method was chosen to do the analysis, as normal distribution of the variables could not be assumed.

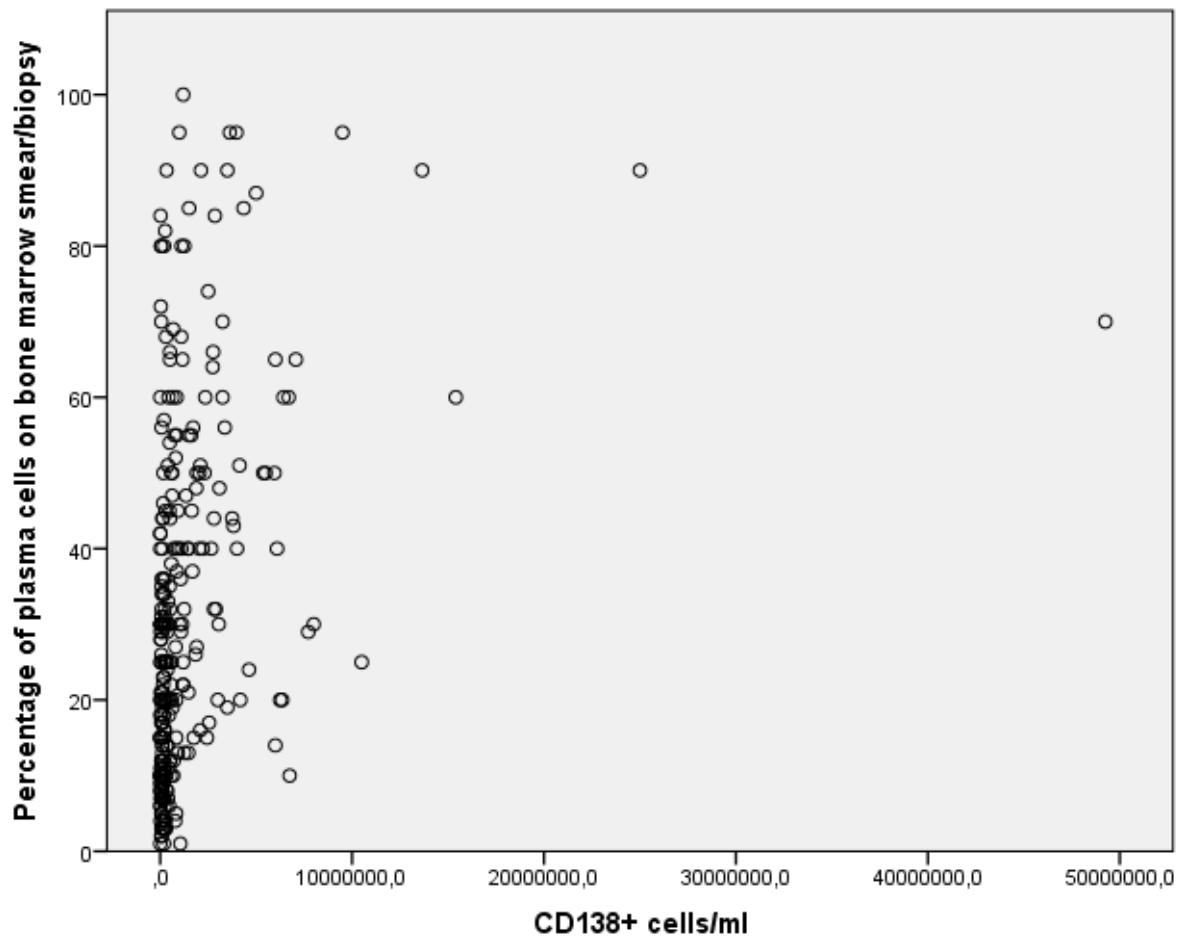
Is there a correlation between plasma cell counts/percentage and time to progression and overall survival?

Progression free survival and overall survival were analysed by Cox survival analysis, as this is a person-time data method where several potential risk variables can be evaluated together.

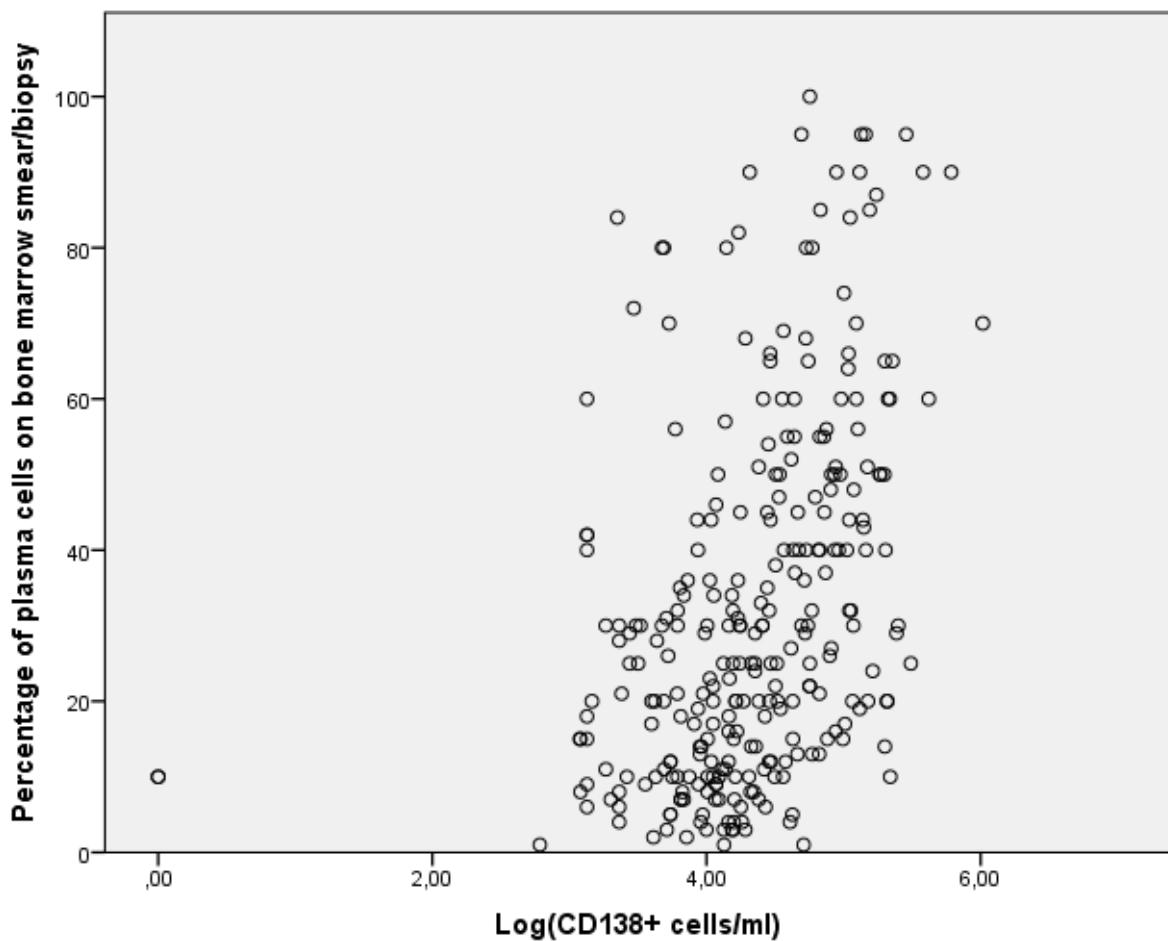
PFS was defined as time from start of treatment to progression or death, whatever came first.
OS was defined as time from start of treatment to death. Co-variates analysed were International Staging System (ISS) score, t(4;14) and del17p. The details are outlined in appendix 2.

Results

Does the CD138 positive cell counts in aspirate correlate with the percentage of plasma cells obtained from light microscopy of the bone marrow smear or biopsy?



The scatterplot of CD138 positive cell counts versus percentage of plasma cells on bone marrow smear/biopsy for 286 cases did not reveal a correlation between the two.



A log transformation of CD138 positive cell count per ml plotted against percentage of plasma cells on bone marrow smear hints to a positive correlation.

Correlation	CD138+ cell count/ml	
Percentage of plasma cells in bone marrow	Correlation coefficient	0.457
	Significance (2-tailed)	0.000

Spearman rank correlation showed a small but statistically significant correlation ($r=0.457$, $p <0.01$).

Is there a correlation between plasma cell counts/percentage and time to progression and overall survival?

Defining event	Co-variable	Proportional hazard ratio (Exp(B))	95% Confidence interval for Exp(B)	
			Lower	Upper
1) PFS	a) 10^5 CD138+ cell increments per ml	1.000	0.996	1.004
2) PFS	a) 10^5 CD138+ cell increments per ml when co-variables ISS, del17p and t(4;14) included	1.000	0.995	1.005
3) OS	a) 10^5 CD138+ cell increments per ml	1.001	0.997	1.005
4) OS	a) 10^5 CD138+ cell increments per ml when co-variables ISS, del17p and t(4;14) included	1.001	0.996	1.005

Defining event	Variable	Proportional hazard ratio (Exp(B))	95% Confidence interval for Exp(B)	
			Lower	Upper
1) PFS	b) 10% increments of Plasma cells on Bone Marrow Smear	1.015	0.929	1.108
2) PFS	b) 10% increments of Plasma cells on Bone Marrow Smear when co-variables ISS, del17p and t(4;14) included	0.997	0.876	1.089
3) OS	b) 10% increments of Plasma cells on Bone Marrow Smear	1.027	0.903	1.168
4) OS	b) 10% increments of Plasma cells on Bone Marrow Smear when co-variables ISS, del17p and t(4;14) included	0.980	0.844	1.138

The cox analyses showed a proportional hazard ratio (exp(B)) close to one for percentage of plasma cells and CD138 positive cell counts. The confidence intervals for CD138 positive cells counts were very narrow, indicating a real lack of correlation between cell numbers and PFS and OS. The above shows that increased number of plasma cells is not associated with increased or decreased risk of progression or death.

The number of patients with deletions and translocations in this study were low, leading to broad confidence intervals. However, the data do show an increased risk of death in patients with del17p.

The results are reported in full in appendix 3.

Discussion

The first analysis shows that there is a small, but significant correlation between percent of plasma cells on a bone marrow smear and number of CD138 positive cells counted by RoboSep™. Considering that these two measurements attempt to quantify the same thing, often procured from samples taken at the same site at the same time, a significant result should not be surprising. If the two measurements were the same, the correlation should be close to 1. When it is not, at least one of the measurements do not accurately reflect the number of plasma cells.

Although plasma cell percentage is used today, it is not a real gold standard. Neither is CD138 positive cell counts, as they are both only surrogates for total tumour mass. Both measure only a fraction of the bone marrow and may be altered by the bone marrow being thinned out by blood. It is difficult to evaluate the representativeness of the samples, as the plasma cells are often distributed in a patch like fashion. The CD138 positive cell count is not conducted immediately. In the mean time, some plasma cells shed their CD138 and will not be picked up by the RoboSep™. With all these inaccuracies to the testing process, the size of the correlation could be considered surprisingly good. Though not good enough for the tests to be considered equal. This made it interesting to do a Cox analysis for both variables.

The data in this study indicate that neither percentage of plasma cells on bone marrow smear nor CD138 positive cell counts can be used to say which patients are at a larger risk of progressing or dying. The confidence intervals for percentage of plasma cells are quite large, whilst the confidence intervals for CD138 positive cells are narrow. Hence, CD138 positive cell counts appear to be the more precise and reliant measurement of the two.

There are three possible explanations for the findings: 1. Tumour load does not significantly affect prognosis, 2. Bone marrow smears or CD138 positive cell counts do not reflect the tumour load in the body, and/or 3. The results are due to random error or flaws in the study.

It has not been possible to find previous studies considering the prognostic value of CD138 positive cell counts. Searches in PubMed with the words “CD138”, “syndecan-1”, “multiple myeloma” and “prognosis” and follow up of references in relevant articles, yielded few relevant results. One study by Dunphy et al. looked at marking bone marrow smears with CD138 antibodies and how this related to prognosis(12).

Dunphy et al. amongst others (9, 12, 13), found no correlation between plasma cell percentages and overall survival. The same authors argue that a biopsy, or the highest number of a biopsy and an aspirate/smear yields prognostic information, whilst an older study did not find that amount of myeloma tissue on a biopsy gave prognostic information(14). It has previously been shown that biopsy tend to have more plasma cells than aspirate(15). Of the mentioned studies on the prognostic value of plasma cell percentage on a smear/aspirate, our study is the largest one. It supports the idea that a smear/aspirate does not give prognostic information and indicates that a lack of precision could be part of the explanation.

One study(14) looked into the distribution of plasma cells from proximal to distal by taking biopsies from the iliac crest, the trochanter major and the proximal tibia. They found a general pattern of the proximal site holding more cells. This supports a theory of uneven distribution. If plasma cell counts by whichever method, do not mirror the persistence or mortality of the disease, it might be because the cell counts do not mirror the tumour load in the body.

The data in this study are collected from the patient's physician or clinical records. Forms filled out for the Biobank were supplied with guidelines. Even so it is likely that some physicians consider response and relapse according to their daily practice. Also, the smears are evaluated by different people, leaving the evaluation vulnerable to inter-observer variability.

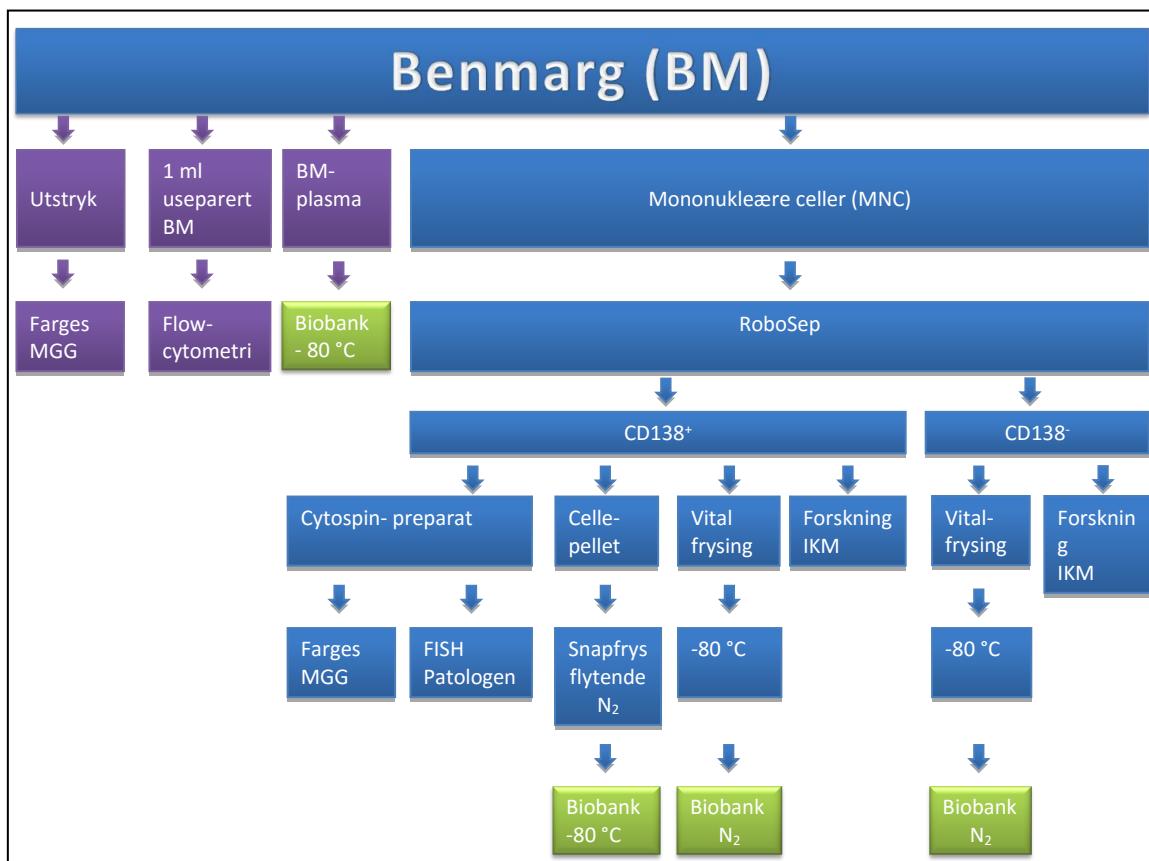
Another weakness to this study is that the chain of possession of data leaves it vulnerable to mistakes, making it difficult to ascertain that all the data in one listing actually pertains to the same person.

It might be that there is a correlation, but that the increase in risk is not linear or is only apparent with larger differences in cell counts. The data used here could be tested in a Kaplan-Meyer analysis with log rank test to evaluate the prognosis for groups of test scores, i.e. 0-30%, 30-60%, and >60% for plasma cells on bone marrow smear. This would increase the steps and get around the problem of linearity.

The two multiple myeloma cell count methods are weakly, but significantly correlated. It is likely that at least one method is inaccurate. CD138 positive cell count seems to be the more precise of the two measurements. Cox analyses show that neither percentage of plasma cells nor CD138 positive cell count give information on risk of progression or death.

1. Spence RAJ, Johnston PG, editors. Oncology. 1st ed. United States: Oxford University Pres; 2001.
2. Kåresen R, Wist E, editors. Kreftsykdommer - en basisbok for helsepersonell. 4th ed. Norway: Gyldendal akademiske; 2012.
3. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology*. 2015;16(12):e538-e48.
4. Fuhler GM, Baanstra M, Chesik D, Somasundaram R, Seckinger A, Hose D, et al. Bone marrow stromal cell interaction reduces Syndecan-1 expression and induces kinomic changes in myeloma cells. *Experimental Cell Research*. 2010;316(11):1816-28.
5. Bayer-Garner IB, Sanderson RD, Dhodapkar MV, Owens RB, Wilson CS. Syndecan-1 (CD138) immunoreactivity in bone marrow biopsies of multiple myeloma: shed syndecan-1 accumulates in fibrotic regions. *Mod Pathol*. 2001;14(10):1052-8.
6. Bataille R, Jeggo G, Robillard N, Barille-Nion S, Harousseau J, Moreau P, et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica*. 2006;91(9):1234-40.
7. Frigyesi I, Adolfsson J, Ali M, Kronborg Christophersen M, Johnsson E, Turesson I, et al. Robust isolation of malignant plasma cells in multiple myeloma. *Blood*. 2014;123(9):1336-40.
8. O'Connell FP, Pinkus JL, Pinkus GS. CD138 (syndecan-1), a plasma cell marker immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 2004;121(2):254-63.
9. Rajkumar SV, Fonseca R, Dispenzieri A, Lacy MQ, Lust JA, Witzig TE, et al. Methods for estimation of bone marrow plasma cell involvement in myeloma: Predictive value for response and survival in patients undergoing autologous stem cell transplantation. *American Journal of Hematology*. 2001;68(4):269-75.
10. Al-Quran SZ, Yang L, Magill JM, Braylan RC, Douglas-Nikitin VK. Assessment of bone marrow plasma cell infiltrates in multiple myeloma: the added value of CD138 immunohistochemistry. *Human Pathology*. 2007;38(12):1779-87.
11. Seidel C, Sundan A, Hjorth M, Turesson I, Dahl IM, Abildgaard N, et al. Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood*. 2000;95(2):388-92.
12. Dunphy CH, Nies MK, Gabriel DA. Correlation of Plasma Cell Percentages by CD138 Immunohistochemistry, Cyclin D1 Status, and CD56 Expression With Clinical Parameters and Overall Survival in Plasma Cell Myeloma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2007;15(3):248-54.
13. Joshi R, Horncastle D, Elderfield K, Lampert I, Rahemtulla A, Naresh KN. Bone marrow trephine combined with immunohistochemistry is superior to bone marrow aspirate in follow-up of myeloma patients. *J Clin Pathol*. 2008;61(2):213-6.
14. Mahmoud LA, Block MH, Franks JJ, Sayed NM. Marrow biopsy and survival in multiple myeloma. *Am J Clin Pathol*. 1983;80(3):363-9.
15. Subramanian R, Basu D, Dutta TK. Prognostic significance of bone marrow histology in multiple myeloma. *Indian J Cancer*. 2009;46(1):40-5.

Appendix 1: Isolation and counting of CD138 positive cells



Prøver til Norsk forskningsbiobank for myelomatose

Forfatter: Lill Anny Gunnes Grøseth, Solveig Kvam

Versjon: 1.4

Godkjent av: Kristine Bodal Solem

ID: 21899

Gyldig fra: 27.04.2015

Revisjonsfrist: 26.04.2017

Hensikt og omfang

Dokumentet skal gi retningslinjer for prøvebehandling og preanalytisk arbeid av prøver som skal lagres i Norsk forskningsbiobank for myelomatose.

Dokumentet omhandler:

Utstyr og reagenser

Rekvirering og registrering

Prøvemateriale

Isolering av mononukleære celler fra perifert blod og benmargsaspirat

Isolering av CD138⁺ celler med RoboSep®

Fordeling av celler fra perifert blod og benmarg

Tillaging av cytospinpreparat av celler fra perifert blod og benmarg

Nedfrysning av celler fra perifert blod og benmarg

Forsendelse av cytospinpreparat til FISH

Grunnlagsinformasjon

Myelomatose er en kreftform som kjennetegnes av ukontrollert vekst i en type celler i benmargen, kalt plasmaceller. Plasmaceller er hvite blodceller som produserer store mengder antistoff. Maligne plasmaceller kalles myelomceller og disse utvikler seg ved myelomatose i et stort antall og fortrenger plassen til de normale cellene i benmargen¹. Plasmaceller/myelomceller har et overflatemolekyl på cellemembranen, CD138. Dette overflatemolekylet finnes kun på denne celletypen og kan benyttes til å separere ut cellene ved hjelp av en immunomagnetisk metode².

Årsaken til myelomatose er ikke kjent¹. Hvert år får 360 personer myelomatose i Norge³, og de fleste er over 60 år¹. Det finnes ingen kur for sykdommen og den gjennomsnittelige overlevelsen ligger mellom seks og syv år.

Det mottas prøver fra pasienter med myelomatose fra hele landet for å bygge opp en Norsk forskningsbiobank for myelomatose. Det blir i hovedsak tatt prøver ved diagnostidspunkt, men også ved tilbakefall. Materiale blir brukt til basalforskning, og som bidrag til kliniske studier med nasjonale og internasjonale samarbeidspartnere. Det blir i tillegg laget cytospinpreparat til FISH som del i diagnostikken.

Ansvar

Bioingeniør

Arbeidsbeskrivelse

Utstyr og reagenser

Utstyr

Sterile rør, 50 mL

Tube, 50 mL

REF 62.547.254

Leverandør: SARSTEDT

Cellstar spissbunnrør, 15 mL

Cellstar tube, 15 mL

REF 188271

Leverandør: VWR International

Rundbunnrør, 5 mL

Round-Bottom Tube, 5 mL

REF 55.525.005

Leverandør: SARSTEDT

Falcon rundbunnrør, 14 mL

14 mL Polystyrene Round-Bottom Tube

REF 0357629

Leverandør: VWR International

Fryserør, 2 mL

Micro tubes, 2 mL

REF 72.694.005

Leverandør: SARSTEDT

CPT rør

BD Vacutainer® CPT

REF 362782

Leverandør: PULS

Oppbevaringseske, fryserør

Papp 10 x 10 hull

REF 95.64.997.

Leverandør: SARSTEDT

Objektglass med merkefelt

Menzel-gläser, Frosted ends

REF: 150702

Leverandør: VWR International

Objektglass, SuperFrost

Menzel-gläser, Superfrost

REF: 572103

Leverandør: VWR International

Oppbevaringseske, objektglass

VWR Microslide box, Cork 100pl, Blue

Cat. No. 631-1500

Leverandør: VWR

RoboSep®

RoboSep® #20000

Leverandør: Stem Cell Technologies

Sentrifuge

Rotina 420R

Hettich Zentrifugen

Leverandør: Houm

Cytospinsentrifuge

Universal 320

Hettich Zentrifugen

Leverandør: Houm

Reagenser

RPMI 1640 medium, 100 mL

RPMI 1640

Cat. No. 21875-042

Leverandør: Invitrogen

RoboSep reagens

EasySep Positive Selection

Human CD138⁺ positive selection kit

Cat. No. 18357

Leverandør: Stem Cell Technologies

RoboSep buffer

RoboSep™ Buffer

Cat. No. 20104

Leverandør: Stem Cell Technologies

Rekvirering og registrering

1. Før det sendes prøver til FISH/Biobank skal rekvirenten varsle Seksjon prøvetaking og pasientnær analyse, Gastrosenteret. Personalet ved laboratoriet fyller ut et skjema med pasient- og rekvirentinformasjon, samt om pasientene er inkludert i noen prosjekt, se dokument [Telefonbestilling FISH/Biobank, skjema for registrering.AMB](#). Myelomgruppa og RoboSepvakt skal varsles om at det kommer prøve.
2. Når prøven er kommet, rekvirer følgende analyser med rekvirentkode MHEP i NSL: Prøvetaking Gastro (997), MA-MGG (0769), BM-Celleseparering (0866) og BM-RoboSep (0867). Analysene Ekstra citratplasma (5334), Ekstra heparinplasma (5333), S-Fryseprøve (5454) og B-Celleseparering (0676) bestilles dersom det er med serum, plasma og EDTA blod fra eksterne pasienter. Rekvirer prøvene på prøvetakingsdato. Prøver fra perifert blod fra interne pasienter skal bestilles av rekvirerende lege. For registrering av prøver fra pasienter i og utenfor vårt pasientregister, se dokument [Registrering av prøver og pasienter i NSL.AMB](#).
3. Merk skjema Telefonbestilling FISH/Biobank med NSL-etiketten: Prøvetaking Gastro. Når det er klart om det blir utført RoboSep eller ikke, føres dette på skjemaet. Send ferdig utfylt skjema til arkivering til Felles prøvemottak, rørpost 430.
4. Materiale som utleveres til forskning skal aidentifiseres og registreres i biobankens registreringsprogram. Merk barkodeetiketten med donornummer og hvilket prøvemateriale beholderen inneholder. Materiale tildeles også et løpenummer som noteres sammen med dato og pasientens navn i ei bok merket *Forskning*. Ved utlevering av materiale til forskning, må den som gjør isoleringen kvittere i boka merket *Forskning* for at prøvemateriale er gitt ut. Boka står i hylla over RoboSep®.
5. Pasientinformasjon føres på skjemaet Pasientoversikt FISH/Biobank, som ligger fremst i permen merket *Biobank myelomatose*. Se dokument [Pasientoversikt FISH/Biobank, skjema for registrering.AMB](#). Her føres det også på hvilket materiale som lagres av pasienten i biobanken.
6. Før opp pasienten på skjemaet Sykehusoversikt FISH/Biobank etter hvilket sykehus pasienten hører til og noter ned om det følger med kliniske opplysninger og samtykke. Se dokument [Sykehusoversikt FISH/Biobank, skjema for registrering.AMB](#). Legg samtykkeerklæring og kliniske opplysninger bak listen for det aktuelle sykehuset.
7. Prøver som frysnes ned i Norsk forskningsbiobank for myelomatose skal merkes med en barkodeetikett, hvilket prøvemateriale røret inneholder og plasseringsinformasjon. Prøvene registreres i Biobankens registreringsprogram. Skriv inn eventuelle merknader om prøven under kommentar i registreringssprgrammet. For registrering av prøver i Biobankens registreringsprogram, se dokument [Prosedyre for bruk av databasen til Regional forskningsbiobank Midt-Norge \(Biobanken\).AMB](#) og [Registrering av biobankprøver ved laboratoriet i Gastrosenteret.AMB](#).

Prøvemateriale

Prøver fra diagnostidspunkt består av fullblod, serum og plasma, samt benmargsaspirat (BM). Det er heparin som blir brukt som antikoagulant i benmargsaspiratet, se dokument [Rekvisisjon FISH/Biobank, Myelomatose.AMB](#). Ved tilbakefall (relapse/residiv) skal det tas vanlig biobankpakke, men dersom det er lagret mononukleære celler fra perifert blod i biobanken kan fullblod sløyfes, men dette må avgjøres for hver relapsepasient.

Avdeling for blodsykdommer ved St. Olavs Hospital sender et serumrør, et prøverør Na-heparinblod, to prøverør citratblod og et BD Vacutainer® CPT Cell preparation Tube (CPT rør) til separering av mononukleære celler fra perifert blod (PB), i tillegg til 20 mL benmarg. Dersom det er nødvendig å la benmargsaspiratet stå til dagen etter før videre behandling, skal det oppbevares i romtemperatur på benk ved Robosep. Dette gjelder kun benmargsaspirat fra St.Olavs Hospital.

Prøver fra perifert blod kan oppbevares på benk til dagen etter, men prøvene må da centrifugeres og serum/plasma pipetteres over i nye rør. EDTA fullblod til isolering av mononukleære celler fra perifert blod kan stå på benk usentrifugert over natt.

Eksterne sykehus sender serum, Na-heparinplasma og citratplasma fra perifert blod. I tillegg sendes EDTA fullblod til separering av mononukleære celler fra perifert blod og 20 mL benmargsaspirat. Benmargsaspirat og prøver fra perifert blod som kommer tilsendt fra andre sykehus må behandles samme dag som prøven kommer.

Serum og plasma fra perifert blod

1. Serum-, heparin- og citrat **prøverør fra St. Olavs Hospital** centrifugeres i 10 minutt, 2200 G, ved 20 °C. Prøver tatt på serumrør må stå i minimum 30 minutt før centrifugering. For centrifugering av serum og plasma, se eget dokument [Sentrifugering av biologisk materiale. AMB](#).
2. **Prøver fra eksterne sykehus** er centrifugert og serum og plasma er overført til rør merket med innhold og pasientinformasjon.
3. Serum, heparinplasma og citratplasma skal fordeles på 3 merkede fryserør med minimum 0,5 mL per rør. Ved lite prøvemateriale, vurder om antallet rør skal reduseres.
4. Registrer serum og plasma i Biobankens registreringsprogram. Skriv inn i kommentarfeltet dersom det er noen merknader om prøven. Se dokument [Prosedyre for bruk av databasen til Regional forskningsbiobank Midt-Norge \(Biobanken\). AMB](#) og [Registrering av biobankprøver ved laboratoriet i Gastrosenteret.AMB](#).
5. Sett fryserør fortløpende i eske merket *Myelomatose/Leukemi Biobank* som er plassert i Gram biobankfryser (FS2) på lab. Merk esken med eskenummer og dato for innsamling av prøvene. Når esken er full flyttes den til -80 °C fryser på lager ved Seksjon prøvetaking og spesiell hematologi.
6. Lag et utstryk av EDTA fullblod fra **eksterne pasienter** for å vurdere kvalitet på cellene og prosentandel plasmaceller. Fremgangsmåte for tillaging av manuelt utstryk er beskrevet i dokument [Blodutstryk - tillaging og ansvar for vurdering AMB/AIT](#). For interne pasienter vil det bli laget utstryk av perifert blod i kombinasjon med tillaging av benmargsutstryk.

Benmargsaspirat

Prosedyren foregår ved romtemperatur til cellene skal frysес. Dette betyr at alle reagenser skal holde 18-25° C ved bruk.

1. Se fremst i permmerket *Biobank myelomatose* om hvilke forskningsprosjekt som skal ha materiale.
2. Noter hvor mye benmarg som mottas på skjemaet Pasientoversikt FISH/Biobank som står fremst i permmerket *Biobank myelomatose*. Se dokument [Pasientoversikt FISH/Biobank, skjema for registrering. AMB](#).
3. Benmargsaspirat som kommer fordelt på flere rør overføres til et 50 mL rør og blandes godt.
4. Lag et utstryk av benmargsaspiratet for å vurdere kvalitet på cellene og prosentandel plasmaceller. Fremgangsmåte for tillaging av manuelt utstryk er beskrevet i dokument [Blodutstryk - tillaging og ansvar for vurdering AMB/AIT](#).
5. Overfør benmargsaspiratet tilbake til orginalrørene dersom de er egnet til centrifugering eller til to 15 mL spissbunnrør.

Benmargsplasma

Fremstill benmargplasma fra benmargsaspiratet før mononukleære celler isoleres.

1. Sentrifuger rørene med benmargsaspirat i 15 minutt, 300 G ved 20 °C, for å skille plasma fra blodlegemer.
2. Overfør benmargsplasma til et 15 mL spissbunnrør og centrifuger i 10 minutt, 2200 G ved 20 °C.
3. Benmargsplasma fordeles på 6 merkede fryserør med minimum 0,5 mL per rør.
4. Registrer fryserørene med benmargsplasma i Biobankens registreringsprogram.
5. Sett fryserørene fortløpende i eske merket *Myelomatose/Leukemi Biobank* som er plassert i Gram biobankfryser (FS2) på lab.

Isolering av mononukleære celler fra perifert blod og benmargsaspirat

Det isoleres mononukleære celler fra både perifert blod og benmargsaspirat.

1. Erstatt volumet av benmargsplasma som er tatt av med RPMI.
2. Isolering av mononukleære celler med CPT rør utføres som beskrevet i dokument [Celleseparering med CPT rør. AMB](#).
3. **Mononukleære celler fra perifert blod** frysес som cellepellet. For tillaging av cellepellet og nedfrysning av mononukleære celler, se dokument [Nedfrysing av mononukleære celler. AMB](#).
4. Dersom antall **mononukleære celler fra benmarg er over 10 millioner**, skal det isoleres CD138⁺ celler med RoboSep[®]. Se avsnitt [Isolering av CD138⁺ celler med RoboSep[®]](#).
5. Dersom antall **mononukleære celler fra benmarg er under 10 millioner** skal det ikke isoleres CD138⁺ celler med RoboSep[®]. Slett analysen BM-RoboSep (0867) i NSL. Gå videre til avsnitt [Tillaging av cytospinpreparat](#). Dersom det er flere celler igjen skal disse frysес ned med fryselsnинг. Se dokument [Nedfrysing av mononukleære celler. AMB](#). Det skal ikke sendes cytospinpreparat til FISH fra disse prøvene.

Isolering av CD138⁺ celler med RoboSep[®]

1. Sentrifuger røret med de mononukleære cellene i 5 min, 450 G ved 20 °C.
2. Fjern supernatanten forsiktig med pipette, men la det være igjen ca 0,5 cm væske over cellepelleten.
3. Bland cellesuspansjonen ved å riste forsiktig på røret.
4. CD138⁺ celler skal isoleres ved hjelp av RoboSep[®]. Velg protokoll ut fra antall mononukleære celler vist i Tabell 1. For oppstart og bruk av RoboSep[®], se eget dokument [RoboSep: oppstart, bruk og vedlikehold. AMB](#).
5. Cellene må resuspanderes i riktig volum RoboSep[®] buffer.

Protokoll 1: Dersom det totale antall mononukleære celler er mellom 20 og 50 millioner skal det tilsettes 0,5 mL RoboSep[®] buffer. Dersom antall celler er over 50 millioner må volum RoboSep[®] buffer som skal tilsettes beregnes i henhold til opplysninger i Tabell 1 (Eksempel 1). Dersom antall celler er så høyt at volumet med RoboSep[®] buffer som skal tilsettes overstiger 2,5 mL, må prøven fordeles på flere kvadranter.

Tabell 1

Protokoll	Antall celler ($\times 10^6$)	Cellekons ($\times 10^6/\text{mL}$)	Minimum volum (mL)	Maksimalt volum (mL)
-----------	------------------------------------	--	-----------------------	-------------------------

1	CD138 -bone marrow	> 20	100	0,5	2,5
2	CD138 -dilute sample	10 -20	5	2,0	4,0
	IKKE RoboSep®	< 10	-	-	-

6. Det blir igjen litt væske i røret når supernatanten fjernes, ta dette med i beregningen når totalvolumet måles ut. Det er viktig at volumet blir mest mulig nøyaktig for å få en vellykket kjøring på RoboSep®.

Eksempel 1 Beregning av volum som skal settes på RoboSep® ved bruk av protokoll 1

$$\begin{array}{l} \text{C1} \times V1 = C2 \times V2 \\ \text{V2} = \frac{C1 \times V2}{C2} \\ \\ V2 = \frac{\text{Telletall Advia} \times \text{fortynningsfaktor} \times \text{volum}}{100 \times 10^6/\text{mL}} \end{array}$$

C1: Telletall ADVIA ($\times 10^6/\text{mL}$)
 V1: Volum prøve (mL)
 C2: $100 \times 10^6/\text{mL}$
V2: mL som skal settes på RoboSep®

Celler talt på Advia
 Fortynning 1:10

C1: $1,89 \times 10^6/\text{mL}$
 V1: 10 mL
 C2: $100 \times 10^6/\text{mL}$
V2: ?

$$V2 = \frac{1,89 \times 10^6/\text{mL} \times 10 \times 10 \text{ mL}}{100 \times 10^6/\text{mL}} = 1,89 \text{ mL}$$

Volumet som settes på RoboSep® skal totalt være 1,89 mL (1890 µL). Resuspander cellepelleten i volum RoboSep® buffer som inklusive volumet som er igjen i røret med cellene blir 1,89 mL. Mål med pipette.

7. Merk rørene som settes på RoboSep® med *pasientidentifikasjon* og henholdsvis CD138+, CD138 Neg eller MNC (mononukleære celler).
8. Isoleringen av CD138+ celler med RoboSep® tar omrent en time.
9. Tilsett 2 mL RPMI til røret med de CD138+ cellene med en gang isoleringen er ferdig. La mediet renne nedover kantene og bland forsiktig med pipette.
10. Sett cellene kjølig til de skal fordeles.
11. Tell både de CD 138+ cellene og de CD138- cellene på ADVIA 2120i ved å lage en 1:10 fortnnning. Ta ut 50 µL av cellesuspensionen og overfør til et merket rundbunnrør med 450 µL RPMI. For analysering av prøver uten barkoder på ADVIA 2120i, se dokument [Advia 2120i, oppstart, bruk, vedlikehold, AMB/AIT](#)
12. Ta utskrift av resultatetene fra Run Screen. Utskriftene merkes med navneetikett og henholdsvis CD138+ og CD138-. Videre beregninger og fordeling av de CD138+ cellene/CD138- cellene føres på før utskriften settes i permen merket *Advia-utskrifter Biobank myelomatose og tidsperiode*. Se Eksempel 2 for beregning av det totale antall CD138+ og CD138- celler

Eksempel 2 Beregning av totalt antall celler

Totalt antall celler =	Telletall ADVIA x 10^6 /mL x fortynningsfaktor x volum (mL)
------------------------	---

13. For å avslutte RoboSep[®], se dokument [RoboSep: oppstart, bruk og vedlikehold. AMB](#).

Fordeling av celler fra perifert blod og benmarg

Mononukleære celler fra perifert blod og benmarg skal fordeles som vist i Tabell 2. Ved isolering av plasmaceller med RoboSep[®] blir det ved isoleringens slutt to cellesuspansjoner, en suspasjon med CD138⁺ celler og en suspasjon med CD138⁻ celler (negativ frakjon). CD138⁺ og CD138⁻ celler fordeles som vist i Tabell 3 og Tabell 4. Dersom det er celler til forskning, ta kontakt med myelomgruppa. For kontaktinformasjon, se dokument [Kontaktinformasjon FISH/Biobank. AMB](#).

Mononukleære celler

Mononukleære celler fra **perifert blod** skal frysес som tørr cellepellet, se dokument [Nedfrysing av mononukleære celler. AMB](#).

Mononukleære celler fra **benmarg**: dersom antall celler er under 10×10^6 skal det ikke kjøres RoboSep[®].

Cellene fordeles da som vist i Tabell 2 med følgende prioritet:

1. Cytospinpreparat
2. Frys i biobank

Tabell 2

Mononukleære celler					
	Antall MNC	Cytospin	Frys i Biobank		Forskning
PB		-	Cellepellet	4 rør á $2,0 \times 10^6$ celler *1	-
BM	<10 mill	600 000	Fryseløsning	2 rør á $4,5 \times 10^6$ celler *2	-

*1 Dersom antall mononukleære celler fra PB er over 8×10^6 celler, fordeles dette på de fire rørene. Dersom det er under 8×10^6 fordeles cellene slik at det er minimum 2 millioner celler per rør.

*2 Dersom antall celler er under 9×10^6 celler, fordeles cellene på rør med minimum 2 millioner celler per rør.

CD138⁺ celler

Isolerte CD138⁺ celler fra RoboSep[®] fordeles som beskrevet i Tabell 3 med følgende prioritet:

1. Cytospinpreparat
2. Frys ned celler som tørr cellepellet i Biobank
3. Frys ned celler med fryseløsning i Biobank
4. Forskning

Tabell 3

CD138 ⁺ celler					
Antall celler	Cytospin	Frys i Biobank		Forskning	
$8,1 \times 10^6$	600 000	Cellepellet	5 rør á $0,7 \times 10^6$ celler	- *1	
		Fryseløsning	2 rør á 2×10^6 celler		
$>8,1 \times 10^6$ *2	600 000	Cellepellet	5 rør á $0,7 \times 10^6$ celler	Se fremst i perm merket Biobank	
			2 rør á 2×10^6 celler		

	Fryseløsning	X rør á $>2 \times 10^6$ celler* ²	
--	--------------	---	--

*¹ Dersom antall CD138⁺ celler er under $8,0 \times 10^6$, skal alt lagres i biobanken. Ingen celler til forskning.

*² Dersom det er igjen CD138⁺ celler etter at myelomgruppa har fått, skal de resterende cellene fordeles på rør med fryselsnring opp til 5×10^6 celler per rør.

Når celler til cytospin, cellepellet og forskning er tatt ut av cellesuspansjonen kan resten centrifugeres ned og tilsettes fryselsnring. For å beregne hvor mange mL som skal tas ut av cellesuspansjonen til cytospin, cellepellet og forskning, se Eksempel 3.

Eksempel 3 Beregning av volum som skal tas ut av cellesuspansjon til forskning, cytospin, cellepellet og celler fryst med fryselsnring

Volum prøve	=	Volum som tas ut
Totalt antall CD138 ⁺ celler		Ønsket antall celler
Bruker cytospin som eksempel ved celleantall på 5,2 millioner celler		
Volum som tas ut	=	$\frac{\text{Ønsket antall celler til cytospin} \times \text{volum prøve}}{\text{Totalt antall CD138}^+ \text{ celler}}$
Volum som tas ut	=	$\frac{0,36 \times 10^6 \times 2 \text{ mL}}{5,2 \times 10^6} = 0,138 \text{ mL}$
0,138 mL (138 µL) av cellesuspansjonen overføres til et rundbunnrør som er fylt med RPMI slik at det totale volumet blir 2,5 mL.		

CD138⁻ celler

Den negative fraksjonen fra RoboSep® fordeles som beskrevet i Tabell 4 med følgende prioritet:

1. Frys ned celler med fryselsnring i Biobank
2. Forskning (trenger minimum 20×10^6 celler)

Tabell 4

CD138 ⁻ celler				
Antall celler	Frys i Biobank		Forskning	
50×10^6	Fryseløsning	5 rør á 10×10^6 celler	50×10^6	Resten* ¹

*¹ Dersom antall CD138⁻ celler er under 50×10^6 , skal alt lagres i biobanken. Ingen celler til forskning.

Når celler til forskning er tatt ut av cellesuspansjonen kan resten centrifugeres ned og tilsettes fryselsnring. For å beregne hvor mange mL som skal tas ut av cellesuspansjonen til forskning, se Eksempel 3.

Nedfrysning av celler fra perifert blod og benmarg

For nedfrysning av mononukleære celler med fryselsnring eller som tørr cellepellet, se dokument [Nedfrysning av mononukleære celler. AMB](#).

Tillaging av cytospinpreparat

Det skal alltid lages et cytospinpreparat av CD138⁺ celler som farges med May Grunvald-Giemsa (MGG).

1. Det skal lages 12 cytospinpreparat. Dersom antall celler er mindre enn 600 000 reduseres antall cytospinpreparat slik at celletettheten per preparat blir riktig, se Tabell 5.

Tabell 5

Celletype	Antall celler per preparat	Antall cytospinpreparat	Antall celler
Mononukleære celler	50 000	12	600 000
CD138 ⁺ celler	50 000	12	600 000

2. Beregn volum (Eksempel 3) som skal tas ut av den mononukleære eller CD138⁺ cellesuspansjonen for å få riktig antall celler per cytospinpreparat (Tabell 5). Tilsett dette til et merket rundbunnrør og fyll opp med RPMI til 2,5 mL.
3. Merk tre objektglass med navn, fødselsnummer og dagens dato. De resterende 9 preparatene merkes med pasientens initialer (fornavn, mellomnavn, etternavn).
4. 200 µL av cellesuspansjonen tilsettes til hvert cytospinkammer.
5. Sentrifuger preparatene i en cytospinsentrifuge i 5 minutt ved 1000 RPM.
6. Sett preparatene i et stativ og la dem lufttørke.
7. Ett cytospinpreparat farges med MGG, monteres og merkes med navnelapp. Dette skal sendes med cytospinpreparatene som skal til FISH undersøkelse. For farging av utstryk med MGG, se eget dokument  [May-Grunwald/Giemsa farging. AMB](#).
8. 11 cytospinpreparater fikseres i absolutt alkohol i 5 minutt og tørkes i 1 døgn. Merk stativet med Fiksert og skriv på om det er mononukleære- eller CD138⁺ celler.
9. 4 cytospinpreparat skal sendes til FISH undersøkelse. Se avsnitt [Forsendelse av cytospinpreparat til FISH](#) for å forberede sending til FISH undersøkelse.
10. De resterende 7 preparatene registreres i biobankens registreringsprogram og lagres i en eske i -20° Gram biobankfryser (FS2) på lab. For å registrere prøver i Biobanken, se dokument  [Prosedyre for bruk av databasen til Regional forskningsbiobank Midt-Norge \(Biobanken\). AMB](#).
11. Cytospinpreparat fra pasienter med tilbakefall (relapse/residiv) sendes ikke til FISH dersom undersøkelsen er utført ved et tidligere tidspunkt. Ett preparat farges med MGG og de resterende 11 fikseres i absolutt alkohol, registreres og lagres i eske i -20° fryser på lab.

Forsendelse av cytospinpreparat til FISH

Cytospinpreparatene undersøkes av bioingeniører ved Seksjon for molekylær patologi, Avdeling for patologi og medisinsk genetikk. Se dokument  [Kontaktinformasjon FISH/Biobank. AMB](#).

1. Fyll ut Histologirekvisisjon som vist i perm merket *Biobank myelomatose*. Merk rekvisjonen med dato for isolering. Den utfylte rekvisjonen skal følge cytospinpreparatene når de sendes videre.
2. 4 fikserte preparat pakkes i transporthylse for blodutstryk. Merk transporthylsen med navneetikett og CD138+ celler.
3. Preparatet som er farget med MGG fargemetode pakkes i egen transporthylse merket med navneetikett og CD138+, MGG, og sendes med cytospinpreparat til FISH. Vi får dette i retur og det skal da arkiveres i romtemperatur i boks som er merket Myelomprosjekt.
4. Fyll ut liste over forsendelse til FISH, skriv på hvor mange preparat som sendes. Merk listen med dato for forsendelse. Se dokument  [Kontaktinformasjon FISH/Biobank. AMB](#). Ta en kopi av det utfylte skjemaet, originalen skal sendes med prøvene. Kopien settes inn i permmerket *Biobank myelomatose*. Send også med utfylt Histologirekvisisjon.

5. Preparatene sendes til Felles prøvemottak i en pose merket *Seksjon for molekylærpatologi, Avdeling for patologi og medisinsk genetikk. FISH. Myelomatose.* Ferdigkrevne forsendelseslapper finnes i permen merket *Biobank myelomatose.*

Litteratur

1. Kreftforeningen.no. (http://www.kreftforeningen.no/om_kreft/kreftformer) (21.02.2012)
2. Pakningsvedlegg EasySep Human CD138 Selection Kit 18357, 2012
3. Kreftregisteret.no (<http://www.kreftregisteret.no/no/Registrene/Kreftstatistikk/>) (21.02.2012)

Relaterte dokumenter

[FISH - Myelomatose \(cytogenetiske avvik\), MolPat Lab](#)

[Forsendelse til FISH. AMB](#)

[Kontaktinformasjon FISH/Biobank. AMB](#)

[Mottak og prøveflyt; myelomatoseprøver til FISH, APMG](#)

[Nedfrysing av mononukleære celler. AMB](#)

[Pasientoversikt FISH/Biobank, skjema for registrering. AMB](#)

[Prosedyre for bruk av databasen til Regional forskningsbiobank Midt-Norge \(Biobanken\). AMB](#)

[Registrering av biobankprøver ved laboratoriet i Gastroenteret.AMB](#)

[Rekvisisjon FISH/Biobank, Myelomatose.AMB](#)

[Sykehusoversikt FISH/Biobank, skjema for registrering. AMB](#)

[Telefonbestilling FISH/Biobank, skjema for registrering.AMB](#)

Vedlegg

[Flytskjema perifert blod og benmarg](#)

[Kortversjon av prøver til norsk forskningsbiobank for myelomatose](#)

Celleseparering med CPT rør. AMB

Forfatter: Lill Anny Gunnes Grøseth, Solveig Kvam Versjon: 2.10
Godkjent av: Kristine Bodal Solem ID: 2957
Gyldig fra: 19.09.2014 Revisjonsfrist: 18.09.2016

Hensikt og omfang

Dokumentet skal sikre riktig fremgangsmåte ved separering av mononukleære celler fra perifert blod og benmarg.

Grunnlagsinformasjon

CPT rør er prøvetakingsrør som brukes til separering av mononukleære celler fra perifert blod og benmarg. CPT rørene er tilsatt natriumcitrat og separasjonsmediet består av en gel laget av polyester og en Ficoll Hypaque løsning. Ved centrifugering vil cellene separeres på grunnlag av sin tetthet. Mononukleære celler har relativt lav tetthet og legger seg over gelen sammen med trombocyter og plasma. Granulocytter og erytrocytter går gjennom gelen og legger seg i bunnen av røret¹.

Ansvar

Bioingeniører

Arbeidsbeskrivelse

Analysemateriale

Perifert blod og benmargsaspirat.

Perifert blod tas enten på et 6 mL EDTA rør eller på et CPT rør.

Holdbarhet og oppbevaring

Perifert blod tatt på EDTA rør kan oppbevares ubehandlet i romtemperatur til neste dag. Perifert blod tatt på CPT rør må centrifugeres og blandes opp før det kan oppbevares i 24 timer ved romtemperatur.

Celleseparering utføres ved Seksjon prøvetaking og pasientnær analyse, Gastroenteret. Laboratoriet har åpent mandag til fredag 07:30 til 15:30. Prøver til celleseparering kan tas fra søndag kl 08:00 til fredag kl 13:00. Utenom laboratoriets åpningstid må prøven tas på EDTA rør.

Utstyr og reagenser

Utstyr

CPT rør

BD Vacutainer® CPT
Art.nr. 362782
Levendør: PULS

Falcon rundbunnrør, 14 mL

14 mL Polystyrene Round-Bottom Tube
Art.nr. 734-0444
Levendør: VWR International

Sentrifuge

Rotina 420 R
Hettich Zentrifugen
Leverandør: Houm

Reagenser

RPMI 1640 medium, 100 mL

Art.nr. 21875-042, Gibco BRL
Oppbevares i kjøleskap
Leverandør: Invitrogen

Fremgangsmåte

Prosedyren foregår ved romtemperatur til de mononukleære cellene er separert ut. Separering av cellene kan påvirkes av temperatur. Dette betyr at alle reagenser må holde 18-25 °C ved bruk.

- Perifert blod fra pasienter med myelomatose;** EDTA rør tilsendt fra eksterne rekvisenter overføres til et merket CPT rør. Ved St. Olavs Hospital tas prøven direkte på et CPT rør eller et 6 mL EDTA prøverør.
- Perifert blod fra pasienter med nyoppdaget Akutt leukemi;** antall CPT rør som tas bestemmes ut fra antall leukocyter talt i perifert blod (Tabell 1). Ved andre diagnosser tas kun 1 rør dersom ingen annen beskjed er gitt.

Tabell 1

Antall leukocyter i perifert blod	Antall CPT rør
< 5 x10 ⁹ /L	3 rør
> 5 x10 ⁹ /L og < 10 x10 ⁹ /L	2 rør
> 10 x10 ⁹ /L	1 rør

- Perifert blod fra pasienter med lymfom;** prøven tas direkte på et CPT rør.
- Benmargsaspirat** overføres til CPT rør merket med *Iøpenummer* og BM. Se dokument  Prøver til Norsk forskningsbiobank for myelomatose . Skyll orginalrørene med RPMI for å få med mest mulig celler. Se Tabell 2 for informasjon om hvor mange CPT rør som skal brukes.

Tabell 2

Mengde benmarg	Antall CPT rør
5 mL	1 CPT rør
5- 10 mL	2 CPT rør
10- 20 mL	3 CPT rør

- Bland innholdet i CPT rørene godt rett før centrifugering.
- Sentrifuger innen 2 timer ved 1500 G ved 20 °C i 30 min.
- Dersom granulocytter og erytrocytter ikke har gått gjennom gelen etter første centrifugering, kan centrifugeringen gjentas en gang.
- De mononukleære cellene skal etter centrifugering ligge i et hvitt sjikt like over gelen. Cellene kan oppbevares i denne suspensjonen i inntil 24 timer ved romtemperatur før man går videre. Vend røret noen ganger før det settes til side.
- Pipetter forsiktig av supernatanten til det er igjen 1-2 mL over det hvite sjiktet. Bland opp resten med pipette. Dersom det ikke er et tydelig skille overføres hele suspensjonen til nytt rør som fylles opp med RPMI. Dette gjelder også dersom CPT røret har stått over natt.
- BM- cellesuspensjon pipetteres over i to Falcon rundbunnrør og PB- cellesuspensjon overføres til ett 15 mL spissbunnrør. Skyll CPT rørene med RPMI for å få med alle cellene. Det kan være en del klumper, disse inneholder celler og skal være med.
- Fyll opp rørene med RPMI til 10 mL.
- Sentrifuger i 15 min, 300 G ved 20 °C.
- Supernatanten fjernes forsiktig med pipette.

14. Mononukleære celler fra **perifert blod** resuspanderes i 10 mL RPMI.

15. Mononukleære celler fra **benmarg** samles i ett rør og resuspanderes i 10 mL RoboSep® buffer.

16. Tell de mononukleære cellene på ADVIA 2120i ved å lage en 1:10 fortynning. Ta ut 50 µL av cellesuspensjonen og overfør til et merket rundbunnrør med 450 µL RPMI. For analysering av prøver uten barkoder på ADVIA 2120i, se dokument [Advia 2120i, oppstart, bruk, vedlikehold, AMB/AIT](#)

17. Utskrift fra Advia 2120i merkes med navneetikett og materiale, og beregninger og fordeling av de mononukleære cellene føres på. Bruk telletallet for hvite blodlegemer fra basokanalen (WBCB) for å beregne totalt antall mononukleære celler i røret (Eksempel 1). Utskrift for pasienter med myelomatose settes i permen merket *Biobank myelomatose*, utskrift for pasienter med leukemi settes i permen *Celleseparering* og utskrift for pasienter med lymfom settes i permen *Biobank lymfom*.

Eksempel 1 Beregning av totalt antall celler

Totalt antall celler = Telletall ADVIA x 10^6 /mL x fortynningsfaktor x volum (mL)

18. For isolering av CD138⁺ celler fra benmarg, se dokument [Prøver til Norsk forskningsbiobank for myelomatose](#) .

19. For nedfrysning av mononukleære celler fra perifert blod og benmarg med fryselsnål eller som tørr cellepellet, se dokument [Nedfrysning av mononukleære celler. AMB](#) .

Referanser

1. Pakningsvedlegg BD Vacutainer® CPT Cell Preparation Tube with Sodium Citrate

Relaterte dokumenter

[Advia 2120i, oppstart, bruk, vedlikehold, AMB/AIT](#)

[Nedfrysning av mononukleære celler. AMB](#)

[Prøver til Norsk forskningsbiobank for myelomatose](#)

[Registrering av biobankprøver ved laboratoriet i Gastroenteret. AMB](#)

Vedlegg

[Kortversjon Celleseparering perifert blod](#)

RoboSep: oppstart, bruk og vedlikehold. AMB

Forfatter: Lill Anny Gunnes Grøseth, Solveig Kvam Versjon: 1.1
 Godkjent av: Kristine Bodal Solem ID: 21747
 Gyldig fra: 27.02.2014 Revisjonsfrist: 27.02.2016

Hensikt og omfang

Dokumentet skal være en hjelp til oppstart, bruk og avslutning av RoboSep®.

Dokumentet omhandler:

Oppstart

Basic Prime

Isolering av CD138⁺ celler

Slå av RoboSep®

Grunnlagsinformasjon

RoboSep® er en pipetteringsrobot som gjennom en immunomagnetisk metode kalt EasySep® kan isolere ønskede cellepopulasjoner ved hjelp av både positiv og negativ seleksjon.

Plasmaceller og myelomceller har et spesifikt overflatemolekyl på cellemembranen som kalles CD138.

Antistoff mot CD138 kan benyttes til å isolere ut disse cellene ved hjelp av RoboSep®. Antistoffet tilsettes en suspansjon med mononukleære celler og binder CD138 som er tilstede. En videre kryssbinding med magnetiske nanopartikler gjør at cellene kan separeres ut når cellesuspansjonen plasseres i et magnetfelt.

Renheten på de isolerte cellene ligger mellom 96-98%. RoboSep® kan benyttes til å isolere celler fra opp til fire prøver samtidig.

Ansvar

Bioingeniører

Arbeidsbeskrivelse

Oppstart

1. Se etter at det er nok renset vann type 2 i flaske på høyre side av instrumentet. Det bør være minst 100 mL.
2. Slå på RoboSep® med bryter på høyre side av flasken med destillert vann.
3. Instrumentet er klart når skjermen viser startbildet <Select Protocol>.
4. Utfør en basic Prime

Basic Prime

1. Trykk på Instrument Tasks øverst til høyre på skjermen.
2. Velg Basic Prime under fanen Maintenance.
3. Trykk Load (grønn knapp) nederst til høyre på skjermen.
4. Sett et 50 mL rør i avfallsposisjonen (waste) i kvadrant 1. Et bilde på skjermen angir korrekt posisjon med en grønn ring.
5. Ta lokket av avfallsrøret.
6. Trykk Run (grønn knapp) nederst til høyre på skjermen.

7. Et lite vindu kommer opp: Confirm Ready to Run. Maskinen spør om alle lokk er tatt av og om bufferflasken er satt på plass. Det trengs ikke buffer flaske i dette steget. Lukk deksel på RoboSep® og trykk Confirm (grønn knapp).
8. Maskinen starter en prime som tar to minutt. Det piper svakt når prime er ferdig utført.
9. Trykk unload nederst til høyre (grønn knapp). Skjermen går automatisk tilbake til startbildet.

Isolering av CD138+ celler

1. Velg <Select Protocol>. Begynn med rad 1 for første prøve. Dette gjelder kvadrant merket 1 på instrumentet.
2. Velg protokoll ut fra antall mononukleære celler i prøven. Se Tabell 1 for valg av protokoll.

Tabell 1

Antall mononukleære celler ($\times 10^6/\text{mL}$)	Protokoll på Robosep	Cellekons. ($\times 10^6/\text{mL}$)	Min. volum (mL)	Maks. volum (mL)
> 20	CD138 -bone marrow	100	0,5	2,5
10 -20	CD138 -dilute sample	5	2,0	4,0
< 10	IKKE RoboSep	-	-	-

3. Det kommer opp et vindu for innlegging av prøvevolum. For beregning av korrekt volum, se dokument [Prøver til Norsk forskningsbiobank for myelomatose](#).
4. Legg inn volum i mL og trykk Enter.
5. Dersom det er mer enn en prøve, gjenta punkt 1-3 for hver prøve. Det er mulig å isolere celler fra fire prøver samtidig og ulike protokoller kan benyttes for hver kvadrant.
6. Trykk Load (grønn knapp) nederst til høyre på skjermen.
7. Dersom det skal isoleres CD138+ celler fra flere enn en prøve med samme protokoll, vil det komme et spørsmål om samme reagens kan benyttes til prøvene (Reagent Sharing). Trykk Yes.
8. Bekreft hvilke kvadranter dette gjelder ved å markere de aktuelle kvadrantene på skjermen. Ved ulike protokoller krever maskinen to sett reagenser.
9. Trykk Done.
10. Prøverør, pipettespisser og reagenser skal nå plasseres på Robosep®.
Til venstre på skjermen kommer det opp en liste over utstyr og reagenser som skal plasseres i kvadranten. Gå igjennom lista ved å trykke på hvert enkelt rør og reagens og plasser på korrekt plass som vist på skjerm med en grønn sirkel. Sample tube er prøven med de mononukleære cellene. Separation tube er et tomt rør som plasseres i magneten der de isolerte CD138+ cellene befinner seg til slutt.
11. Legg inn Lotnummer (5 siste siffer på rørene) for Positive Selection Coctail vial (■) og Magnetic Particle vial (5).
12. Pass på at det er nok volum i reagenser og i RoboSep® Buffer. Minimum volum står på skjermen under hvert reagens. RoboSep® ber om 100 µL mer enn den kommer til å bruke.
13. Sjekk at alle rør og tipper sitter godt på plass og er uten lokk. Lukk dekslet på RoboSep® og trykk Run

(grønn knapp) nederst til høyre.

14.Et lite vindu kommer opp: Confirm Ready to Run. Ekstra sjekk at alle lokk er tatt av. Trykk Confirm.

15.Det tar omrent 50 min før prøvene er ferdig. Nederst på skjermen står det hvor lang tid det er igjen.

Slå av RoboSep®

1. Ta alle rør og tipper ut av RoboSep®. Avfallsrørene inneholder bare renset vann og kan derfor tømmes og settes tilbake på maskinen med lokk på.
2. Lukk dekslet til RoboSep®.
3. Velg Instrument Task øverst til høyre på skjermen. Velg Basic Shutdown protocol under fanen Maintenance.
4. Maskinen avslutter og skjermen blir svart. Dette tar ca 2 min.
5. Slå av bryteren til høyre på instrumentet.

Relaterte dokumenter

[Prøver til Norsk forskningsbiobank for myelomatose](#)

Appendix 2: Cox analyses

Input

The following cox analyses were run (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a and 4b):

1. Time: PFS, Status: Event PFS
 - a. Co-factors: CD138 positive cells/ml (cell count/10⁵)
 - b. Co-factors: Plasma cell percentage on smear (in 10% increments)
2. Time: PFS, Status: Event PFS
 - a. Co-factors: CD138 positive cells/ml (cell count/10⁵), ISS, t(4;14) and del17p
 - b. Co-factors: Plasma cell percentage on smear (in 10% increments), ISS, t(4;14) and del17p
3. Time: OS, Status: Event OS
 - a. Co-factors: CD138 positive cells/ml (cell count/10⁵)
 - b. Co-factors: Plasma cell percentage on smear (in 10% increments)
4. Time: OS, Status: Event OS
 - a. Co-factors: CD138 positive cells/ml (cell count/10⁵), ISS, t(4;14) and del17p
 - b. Co-factors: Plasma cell percentage on smear (in 10% increments), ISS, t(4;14) and del17p

Event PFS is whether or not the patient has progressed or died. Event OS is whether or not the patient is dead.

The output of Cox analysis is in the form of β and exponential β ($\exp(B)$). The $\exp(B)$ is a hazard ratio between the mean value of the variable and one number higher. By entering the cell numbers in hundred thousands and 10 percents, the output will pertain to the ratio between the mean and a hundred thousand more cells or 10 percent more. This is more useful than for one cell or percent, as difficulty establishing exact percentage and imperfect counting of CD138 positive plasma cells could lead to small differences in plasma cell percentages and plasma cell counts.

Output

Defining event	Co-variable	Exp(B) for CD138+	95% Confidence interval for Exp(B)	
			Lower	Upper
1) PFS	a) No CD138+ per ml	1.000	1.000	1.000
1) PFS	a) 10 ⁵ No CD138+ per ml	1.000	0.996	1.004

2) PFS	a) 10^5 No CD138+ per ml when co-variables ISS, del17p and t(4;14) included	1.000	0.995	1.005
3) OS	a) 10^5 No CD138+ per ml	1.001	0.997	1.005
4) OS	a) 10^5 No CD138+ per ml when co-variables ISS, del17p and t(4;14) included	1.001	0.996	1.005

The Exp(B) for CD138 positive cell counts in hundred thousands are 1.000 to 1.001, indicating that the increased risk for each successive, additional 100 000 cells is none to negligible. The confidence intervals are narrow.

Defining event	Variable	Exp(B) for increments of Plasma cells	95% Confidence interval for Exp(B)	
			Lower	Upper
1) PFS	b) 1% increments of Plasma cells on Bone Marrow Smear	1.001	0.993	1.010
1) PFS	b) 10% increments of Plasma cells on Bone Marrow Smear	1.015	0.929	1.108
2) PFS	b) 10% increments of Plasma cells on Bone Marrow Smear when co-variables ISS, del17p and t(4;14) included	0.997	0.876	1.089
3) OS	b) 10% increments of Plasma cells on Bone Marrow Smear	1.027	0.903	1.168
4) OS	b) 10% increments of Plasma cells on Bone Marrow Smear when co-variables ISS, del17p and t(4;14) included	0.980	0.844	1.138

The exp(B) for percentage of plasma cells on bone marrow smears in 10% steps range from 0,980 to 1.027. Exp(B) is above one when tested alone and below one when corrected for ISS, t(4;14) and del17p, but never far from one. The confidence intervals always include values above and below one and are not markedly skewed.

Due to missing data, SPSS did not include all the patient for each analysis. 160 patients were included for 1a and b, 124 for 2a and b, 158 for 3a and b, and 119 for 4a and b. Of the 160, 98 were men and 62 were women. The mean age at start of treatment was 66,7 (range 38-87). 15 patients had a translocation 4;14 and 18 had a del17p. There were 36 patients with ISS score 1, 51 with ISS 2 and 37 with ISS 3.

Appendix 3: Cox regression results from SPSS

1a. Cox Regression CD138+ cells/ml for progression free survival

Case Processing Summary		N	Percent
	Event ^a	86	38.6%
Cases available in analysis	Censored	74	33.2%
	Total	160	71.7%
	Cases with missing values	63	28.3%
	Cases with negative time	0	0.0%
Cases dropped	Censored cases before the earliest event in a stratum	0	0.0%
	Total	63	28.3%
	Total	223	100.0%

a. Dependent Variable: PFS uncensored and censored

Block 0: Beginning Block

**Omnibus Tests
of Model**

Coefficients

-2 Log Likelihood
682.296

Block 1: Method = Enter

Omnibus Tests of Model Coefficients^a

-2 Log Likelihood	Overall (score)			Change From Previous Step			Change From Previous Block		
	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.
682.291	.005	1	.944	.005	1	.944	.005	1	.944

a. Beginning Block Number 1. Method = Enter

Variables in the Equation

	B	SE	V Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% CI for Exp(B)	
								Lower
CD138+ml	.000	.000	.005	1	.944	1.000	1.000	1.000

Covariate Means	
	Mean
CD138+/ml	1696349.526

1a. Cox Regression with CD138+ cells (*10^5) for progression free survival

		N	Percent
Cases available in analysis	Event ^a	84	37.8%
	Censored	76	34.2%
	Total	160	72.1%
Cases dropped	Cases with missing values	62	27.9%
	Cases with negative time	0	0.0%
	Censored cases before the earliest event in a stratum	0	0.0%
	Total	62	27.9%
	Total	222	100.0%

a. Dependent Variable: PFS uncensored and censored

Block 0: Beginning Block

**Omnibus Tests
of Model**

Coefficients

-2 Log Likelihood
664.646

Block 1: Method = Enter

Omnibus Tests of Model Coefficients^a

-2 Log Likelihood	Overall (score)			Change From Previous Step			Change From Previous Block		
	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.
664.646	.000	1	1.000	.000	1	1.000	.000	1	1.000

a. Beginning Block Number 1. Method = Enter

Variables in the Equation

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
CD138+ (/10 ⁵)/ml	.000	.002	.000	1	1.000	1.000	.996	1.004

Covariate Means	
	Mean
CD138+ (/10^5)/ml	16.963

2a. Cox Regression with CD138+ cells (*10⁵), ISS score and cytogenetic abnormalities for progression free survival

Case Processing Summary		
	N	Percent
Event ^a	65	29.3%
Cases available in analysis		
Censored	59	26.6%
Total	124	55.9%
Cases with missing values	98	44.1%
Cases with negative time	0	0.0%
Cases dropped		
Censored cases before the earliest event in a stratum	0	0.0%
Total	98	44.1%
Total	222	100.0%

a. Dependent Variable: Progress free survival uncensored and censored

		Categorical Variable Codings ^a		
		Frequency	(1)	(2)
ISS stadium ^b	1	36	1	0
	2	51	0	1
	3	37	0	0

- a. Category variable: ISS stadium (ISS)
 b. Indicator Parameter Coding

Block 0: Beginning Block

Omnibus Tests
of Model

Coefficients

-2 Log
Likelihood
487.193

Block 1: Method = Enter

Omnibus Tests of Model Coefficients^a

-2 Log Likelihood	Overall (score)			Change From Previous Step			Change From Previous Block		
	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.
483.000	4.931	5	.424	4.193	5	.522	4.193	5	.522

a. Beginning Block Number 1. Method = Enter

Variables in the Equation

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
CD138+ cells/ml divided by 10^5	.000	.003	.008	1	.927	1.000	.995	1.005
de117p (No=0, Yes=1)	.699	.350	3.991	1	.046	2.012	1.013	3.995
t(4;14) (No=0, yes=1)	-.245	.459	.284	1	.594	.783	.318	1.926
ISS stadium			.078	2	.962			
ISS stadium(1)	-.099	.356	.078	1	.780	.905	.451	1.818
ISS stadium(2)	-.046	.311	.022	1	.882	.955	.519	1.758

Covariate Means	
	Mean
CD138+ cells/ml divided by 10 ⁵	18.437
del17p (No=0, Yes=1)	.121
t(4;14) (No=0, yes=1)	.113
ISS stadium(1)	.290
ISS stadium(2)	.411

3a. Cox Regression with CD138+ cells (*10⁵) for overall survival

Case Processing Summary		N	Percent
Event ^a		43	26.9%
Cases available in analysis	Censored	115	71.9%
Total		158	98.8%
Cases with missing values		0	0.0%
Cases with negative time		0	0.0%
Cases dropped	Censored cases before the earliest event in a stratum	2	1.3%
Total		2	1.3%
		160	100.0%

a. Dependent Variable: Time to death or censor

Block 0: Beginning Block

Omnibus Tests of Model

Coefficients

-2 Log Likelihood	346.802
-------------------	---------

Block 1: Method = Enter

Omnibus Tests of Model Coefficients^a

-2 Log Likelihood	Overall (score)			Change From Previous Step			Change From Previous Block		
	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.
346.651	.167	1	.682	.151	1	.698	.151	1	.698

a. Beginning Block Number 1. Method = Enter

Variables in the Equation

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
Number of CD138+ cells (*10 ⁵)/ml	.001	.002	.166	1	.683	1.001	.997	1.005

Covariate Means	
	Mean
Number of CD138+ cells (*10 ⁵)/ml	17.085

4a. Cox Regression with CD138+ cells (*10⁵), ISS score and cytogenetic abnormalities for overall survival

Case Processing Summary		N	Percent
Event ^a	Censored	36	22.5%
Cases available in analysis	Total	83	51.9%
	Cases with missing values	119	74.4%
Cases dropped	Cases with negative time	36	22.5%
	Censored cases before the earliest event in a stratum	0	0.0%
	Total	5	3.1%
	Total	41	25.6%
	Total	160	100.0%

a. Dependent Variable: Time to death or censor

Categorical Variable Codings ^a		Frequency	(1)	(2)
International Staging	1.00	36	1	0
System score ^b	2.00	51	0	1
	3.00	37	0	0

- a. Category variable: International Staging System score (ISS)
 b. Indicator Parameter Coding

Block 0: Beginning Block

Omnibus Tests
of Model

Coefficients

-2 Log
Likelihood
270.135

Block 1: Method = Enter

Omnibus Tests of Model Coefficients^a

-2 Log Likelihood	Overall (score)			Change From Previous Step			Change From Previous Block		
	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.
260.579	13.325	5	.021	9.556	5	.089	9.556	5	.089

a. Beginning Block Number 1. Method = Enter

Variables in the Equation

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
International Staging System score	-.223	.481	.554	2	.758			
International Staging System score(1)	-.304	.415	.534	1	.642	.800	.312	2.052
International Staging System score(2)								
Translocation 4;14	-.075	.668	.013	1	.465	.738	.327	1.666
Deletion of 17p	1.231	.428	8.251	1	.910	.928	.251	3.434
Number of CD138+ cells (*10^5)/ml	.001	.002	.127	1	.004	3.424	1.478	7.930
						1.001	.996	1.005

Covariate Means	
	Mean
International Staging System score(1)	.294
International Staging System score(2)	.420
Translocation 4;14	.109
Deletion of 17p	.126
Number of CD138+ cells (*10^5)/ml	18.950

1b. Cox Regression with plasma cell percentage for progression free survival

Case Processing Summary		
	N	Percent
Event ^a	85	38.1%
Cases available in analysis	75	33.6%
Total	160	71.7%
Cases with missing values	63	28.3%
Cases with negative time	0	0.0%
Censored cases before the earliest event in a stratum	0	0.0%
Total	63	28.3%
Total	223	100.0%

a. Dependent Variable: PFS uncensored and censored (in days)

Block 0: Beginning Block

Omnibus Tests of Model

Coefficients

-2 Log Likelihood			
	Chi-square	df	Sig.
673.426	.106	1	.745

Block 1: Method = Enter

Omnibus Tests of Model Coefficients^a

-2 Log Likelihood	Overall (score)			Change From Previous Step			Change From Previous Block		
	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.
673.532							.746	.105	.746

a. Beginning Block Number 1. Method = Enter

Variables in the Equation						
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Percent plasma cells in bone marrow	.001	.004	.106	1	.745	1.001

Covariate Means

	Mean
Percent plasma cells in bone marrow	33.981

1b. Cox Regression with plasma cell percentage (*10) for progression free survival

Case Processing Summary		N	Percent
Cases available in analysis	Event ^a	85	38.1%
	Censored	75	33.6%
	Total	160	71.7%
Cases dropped	Cases with missing values	63	28.3%
	Cases with negative time	0	0.0%
	Censored cases before the earliest event in a stratum	0	0.0%
	Total	63	28.3%
		223	100.0%

a. Dependent Variable: PFS uncensored and censored (in days)

Block 0: Beginning Block

Omnibus Tests
of Model
Coefficients

-2 Log
Likelihood

673.532

Block 1: Method = Enter

Omnibus Tests of Model Coefficients^a

-2 Log Likelihood	Overall (score)			Change From Previous Step			Change From Previous Block		
	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.
673.426	.106	1	.745	.105	1	.746	.105	1	.746

a. Beginning Block Number 1. Method = Enter

Variables in the Equation

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
div10percentPC	.015	.045	.106	1	.745	1.015	.929	1.108

Covariate Means

	Mean
div10percentPC	3.398

2b. Cox Regression with plasma cell percentage (*10), ISS score and cytogenetic abnormalities for progression free survival

Case Processing Summary		N	Percent
Cases available in analysis	Event ^a	66	41.3%
	Censored	58	36.3%
	Total	124	77.5%
Cases dropped	Cases with missing values	36	22.5%
	Cases with negative time	0	0.0%
	Censored cases before the earliest event in a stratum	0	0.0%
	Total	36	22.5%
		160	100.0%

a. Dependent Variable: PFS uncensored and censored

Categorical Variable Codings ^a			
	Frequency	(1)	(2)
ISS stadium ^b			
1	36	1	0
2	51	0	1
3	37	0	0

a. Category variable: ISS stadium (ISSstadium)

b. Indicator Parameter Coding

Block 0: Beginning Block

**Omnibus Tests
of Model**

Coefficients

-2 Log Likelihood
491.145

Block 1: Method = Enter

Omnibus Tests of Model Coefficients^a

-2 Log Likelihood	Overall (score)			Change From Previous Step			Change From Previous Block		
	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.
491.145	5.040	5	.411	4.397	5	.494	4.397	5	.494

a. Beginning Block Number 1. Method = Enter

	Variables in the Equation						
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)
PercentagePC_div10	-.024	.056	.182	1	.670	.977	.876
del17 (No=0, yes=1)	.670	.347	3.719	1	.054	1.954	.989
t(4;14) (No=0, yes=1)	-.221	.460	.231	1	.631	.802	.325
ISS stadium			.329	2	.848		1.975
ISS stadium(1)	-.210	.375	.315	1	.575	.810	.388
ISS stadium(2)	-.127	.311	.166	1	.684	.881	.479
							1.620

Covariate Means

	Mean
PercentagePC_div10	3.489
del17 (No=0, yes=1)	.121
t(4;14) (No=0, yes=1)	.113
ISS stadium(1)	.290
ISS stadium(2)	.411

3b. Cox Regression with plasma cell percentage (*10) for overall survival

Case Processing Summary		N	Percent
Cases available in analysis	Event ^a	36	16.2%
	Censored	83	37.4%
	Total	119	53.6%
Cases dropped	Cases with missing values	98	44.1%
	Cases with negative time	0	0.0%
	Censored cases before the earliest event in a stratum	5	2.3%
	Total	103	46.4%
	Total	222	100.0%

a. Dependent Variable: Time to death censored/uncensored

Categorical Variable Codings ^a			
	Frequency	(1)	(2)
ISS stadium ^b			
1	36	1	0
2	51	0	1
3	37	0	0

a. Category variable: ISS stadium (ISSstadium)

b. Indicator Parameter Coding

Block 0: Beginning Block

Omnibus Tests

of Model

Coemlients	-2 Log Likelihood	270.135
------------	-------------------	---------

Block 1: Method = Enter

Omnibus Tests of Model Coefficients ^a						
-2 Log Likelihood	Overall (score)			Change From Previous Step		Change From Previous Block
	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.
260.624	13.245	5	.021	9.510	5	.090
						9.510
						5
						.090

a. Beginning Block Number 1. Method = Enter

Covariate Means	
	Mean
div10percentPC	3.564
Translocation(4;14)	.109
Deletion of 17p	.126
ISS stadium(1)	.294
ISS stadium(2)	.420

4b. Cox Regression with plasma cell percentage (*10), ISS score and cytogenetic abnormalities for overall survival

Case Processing Summary			
		N	Percent
Cases available in analysis	Event ^a	43	19.4%
	Censored	115	51.8%
Total		158	71.2%
Cases with missing values		62	27.9%
Cases with negative time		0	0.0%
Censored cases before the earliest event in a stratum		2	0.9%
Total		64	28.8%
Total		222	100.0%

a. Dependent Variable: Time to death censored/uncensored

Block 0: Beginning Block

Omnibus Tests of Model

Coefficients

-2 Log Likelihood			
	Chi-square	df	Sig.
346.638	.166	1	.683

Block 1: Method = Enter

Omnibus Tests of Model Coefficients^a

-2 Log Likelihood	Overall (score)			Change From Previous Step			Change From Previous Block		
	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.
346.638	.166	1	.683	.164	1	.685	.164	1	.685

a. Beginning Block Number 1. Method = Enter

Variables in the Equation

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% CI for Exp(B)	
div10percentPC	.027	.066	.166	1	.684	1.027	.903	1.168

Covariate Means

	Mean
div10percentPC	3.407