



FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

Institutt for bioingeniørfag

Norges teknisk- naturvitenskapelige universitet
Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

**Flowcytometrisk immunfenotyping ved
diagnostikk av KLL – en sammenlikningsstudie**

**Flow cytometric immunophenotyping in the
diagnosis of CLL – a comparative study**

Av / by

Sunniva Asprem
Mari Hamre Bu

Trondheim, 2021

Forord

Denne bacheloroppgaven er skrevet som en avsluttende oppgave på Bachelor i bioingeniørfag ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Trondheim. Oppgaven ble gitt ved Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Enhet for Cytometri av fagansvarlig bioingeniør Kristin Sollihaug og spesialbioingeniør Gunnhild Vatne Leirvik, som også var våre faglige veiledere.

I forbindelse med utforming av og arbeidet med bacheloroppgaven, ønsker vi å takke Kristin og Gunnhild for god faglig veiledning. Vi vil også rette en stor takk til prosessveileder Eli Kjøbli fra Institutt for bioingeniørfag ved NTNU for god veiledning og hjelp ved utforming av oppgaven, og for raske og grundige svar på spørsmål vi har hatt underveis. Til slutt vil vi takke for tilgang til prosedyrer fra sykehuslaboratoriene i Bergen, Oslo og Tromsø fra henholdsvis seksjonsleder Jannike Lundervik Sælen, spesialbioingeniør Ingunn Østlie og spesialbioingeniør Goran Kaurić.

Det har vært en lærerik oppgave og et spennende fagfelt å jobbe med. Vi har tilegnet oss mye kunnskap og erfaringer som vi vil ta med oss videre.

Sunniva Asprem

Sunniva Asprem

Mari Hamre Bu

Mari Hamre Bu

Trondheim, 19.05.2021

Sammendrag

Kronisk lymfatisk leukemi (KLL) er den vanligste formen for leukemi i den vestlige verden, og i Norge diagnostiseres omtrent 300 personer i året med sykdommen. En viktig del av utredningen av KLL-pasienter er flowcytometrisk immunfenotyping. Ved laboratoriet ved Enhet for Cytometri, Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin på St. Olavs Hospital i Trondheim var det ønskelig å kartlegge hvor store forskjeller det er mellom prosedyrene som blir brukt på laboratoriet i Trondheim, prosedyrer som benyttes ved andre sykehuslaboratorier i Norge, og standarder ved prøvebehandling som er utarbeidet av Euroflow, ved mistanke om KLL.

Metodene som ble brukt for å kartlegge forskjeller var observasjon på laboratoriet, og innhenting og gjennomgang av prosedyrer og paneler. Prosedyrene og panelene ble innhentet fra EuroFlow og laboratoriene som utfører flowcytometrisk immunfenotyping i Trondheim, Oslo, Bergen og Tromsø.

Det ble utformet tabeller for å presentere resultatene fra sammenlikningen på en strukturert måte. EuroFlows anbefalinger for prøvepreparering blir i all hovedsak fulgt av alle laboratoriene som er inkludert i denne sammenlikningsstudien. Blant forskjellene som ble observert var ulike strategier for panelbruk, ulikt volum prøvemateriale som ble vasket, og ulik komposisjon av vaskebuffer. Når det kommer til strategi for panelbruk følger laboratoriene i Trondheim, Bergen og Oslo anbefalinger som er gitt av EuroFlow, mens laboratoriet i Tromsø benytter seg av et større screeningpanel for så å rette seg inn mot en spesifikk diagnose. Ved laboratoriet i Trondheim vaskes alt prøvemateriale tre ganger, hvilket er avvikende fra anbefalingen gitt av EuroFlow og fra prosedyrene til de andre laboratoriene. I tillegg benytter laboratoriene i Trondheim og Oslo en vaskebuffer uten NaN_3 , i motsetning til vaskebufferen som er anbefalt av EuroFlow.

Det antas at forskjellene i liten grad har en konsekvens for metodenes diagnostiske sensitivitet eller spesifisitet, men at de derimot kan ha en konsekvens for økonomi og tidsbruk på sykehuslaboratoriene.

Abstract

Chronic lymphatic leukemia (CLL) is the most common form of leukemia in the western world, and about 300 people a year are diagnosed with the disease in Norway. An important part in diagnosing CLL patients is flow cytometric immunophenotyping. At the laboratory at the Unit for Cytometry, Department of Immunology and Transfusion Medicine at St. Olavs Hospital in Trondheim, it was desirable to map the differences between the procedures used in the laboratory in Trondheim, procedures used in other laboratories at hospitals in Norway, and standards for sample handling by EuroFlow, when there is a suspicion of CLL.

The methods used to map the differences were observation in the laboratory, and collection and review of procedures and panels. The procedures and panels were obtained from EuroFlow and the laboratories that perform flow cytometric immunophenotyping in Trondheim, Oslo, Bergen and Tromsø.

Tables were designed to present the results from the comparison in a structured way. EuroFlow's sample preparation recommendations are followed by essentially all the laboratories included in this comparative study. Among the differences that were observed were different strategies for panel use, different volume of specimen that gets washed, and different composition of the wash buffer. When it comes to the strategy for panel use, the laboratories in Trondheim, Bergen and Oslo follow the recommendations given by EuroFlow, while the laboratory in Tromsø uses a larger screening panel before focusing on a specific diagnosis. At the laboratory in Trondheim, all specimen is washed three times, which deviates from the recommendation given by EuroFlow, and from procedures from the other laboratories. Additionally, the laboratories in Trondheim and Oslo use a wash buffer without NaN_3 , in contrast to the wash buffer recommended by EuroFlow.

It is assumed that the differences have little consequence for the diagnostic sensitivity or specificity of the methods, but they may have a consequence for finances and time usage in the hospital laboratories.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract.....	III
1. Innledning.....	1
1.1. Kronisk lymfatisk leukemi.....	1
1.1.1. Utvikling av B-lymfocytter	1
1.1.2. Patogenese	3
1.1.3. Diagnostisering.....	5
1.1.4. Behandling.....	7
1.2. Flowcytometri	8
1.2.1. Immunfenotypisk flowcytometri	8
1.2.2. Innstilling av flowcytometeret.....	9
1.2.3. Antistoff og antistofftitrering.....	11
1.2.4. Gating	12
1.3. EuroFlow.....	13
1.4. Problemstilling.....	17
2. Materiale og metode	18
2.1. Innhenting av informasjon om flowcytometrisk immunfenotyping	18
2.2. Utarbeidelse av sammenlikningstabeller	19
3. Resultater	20
3.1. Sammenlikning av flowcytometer og instrumentinnstilling.....	21
3.2. Sammenlikning reagenser og løsninger	23
3.3. Forbehandling av prøver før antistoffmerking.....	25
3.4. Antistoffmerking.....	28
3.5. Markører og fluorokromer	32

4. Diskusjon	37
5. Konklusjon.....	45
6. Referanser	46
7. Vedlegg.....	49
Vedlegg 1: SOP for forbehandling og merking fra Euroflow	49
Vedlegg 2: Anbefalte paneler fra EuroFlow for diagnose av KLL	57
Vedlegg 3: Prosedyre for forbehandling og merking fra laboratoriet i Trondheim	59
Vedlegg 4: Panel med rør som benyttes ved mistanke om KLL ved laboratoriet i Trondheim	73
Vedlegg 5: Prosedyre for forbehandling og merking fra laboratoriet i Bergen.....	74
Vedlegg 6: Paneler som benyttes ved mistanke om KLL ved laboratoriet i Bergen.....	84
Vedlegg 7: Prosedyre for forbehandling og merking fra laboratoriet i Oslo.....	87
Vedlegg 8: Panel med rør som benyttes ved mistanke om KLL ved laboratoriet i Oslo	91
Vedlegg 9: Prosedyre for forbehandling og merking fra laboratoriet i Tromsø.....	92
Vedlegg 10: Prosedyre for forbehandling og merking ved utvidet analyse fra laboratoriet i Tromsø.....	95
Vedlegg 11: Screeningpanel som benyttes ved laboratoriet i Tromsø, og ekstra rør som kan tilføyes	98
Vedlegg 12: Panel med rør som benyttes ved mistanke om KLL fra laboratoriet i Tromsø	99
Vedlegg 13: E-poster sendt til, og mottatt fra kontaktpersoner ved laboratoriene i Oslo, Bergen og Tromsø	100

1. Innledning

Kronisk lymfatisk leukemi (KLL) er en kreftform som rammer rundt 300 personer av den norske befolkning i året, og diagnostiseringen av KLL er blant annet avhengig av flowcytometrisk immunfenotyping. (1) Immunfenotypingen innebærer at antistoff konjugert til fluorokromer bindes til leukocytter i pasientprøven. Hvilken antistoffkombinasjon som er mest relevant å bruke ved diagnose av KLL finnes det ingen definitiv konsensus om. Euroflow er et europeisk organ som har utformet prosedyrer og antistoffpaneler for å standardisere denne delen av diagnostiseringen av KLL.

1.1. Kronisk lymfatisk leukemi

KLL er leukemiformen som har størst insidens i den vestlige verden. Sykdommen er oftest diagnostisert hos personer over 65 år, og median alder for diagnositidspunkt er 72 år. KLL er mer utbredt blant menn enn blant kvinner. (1)

1.1.1. Utvikling av B-lymfocytter

KLL er en blodsykdom som stammer fra B-lymfocyttenes cellelinje. (2) Under modningen av en B-lymfocytt vil cellen ved forskjellige stadier i B-cellelinjen ha karakteristiske trekk. Disse blir gjenkjent basert på uttrykk av ulike immunoglobuliner, immunoglobulin-genuttrykk og overflatemarkører. (3) Overflatemarkører kalt Cluster of Differentiation (CD) kommer til uttrykk i ulik grad ved forskjellige differensieringssteg hos B-lymfocytter, som vist i figur 1. Dette er markører som viser karakteristiske egenskaper hos en celle eller en cellype. (4) CD-markører benyttes ved flowcytometrisk immunfenotyping til å gjenkjenne leukocytter fra ulike cellelinjer og differensieringsstadier i flowcytogram. Eksempler på CD-markører som gjenkjenner en spesifikk cellelinje er CD-markørene CD19 og CD20 som kjennetegner B-lymfocytter. CD45 kjennetegnes som en CD-markør som uttrykkes på alle leukocytter. (2)

Utvikling av B-lymfocytter starter i beinmargen fra den hematopoetiske stamcellen (HSC), som er utgangspunktet for dannelse av alle blodceller. HSC differensieres og danner en lymfoid progenitorcelle (pro-B celle), som er cellen som kan gi opphav til alle lymfoide cellelinjer (B-, T- og NK-celler). Flere CD-markører er karakteristiske for en pro-B-celle, disse er blant andre CD10, CD19, CD20, CD79 α og CD38. (3) Under modningen av B-cellen i beinmargen skjer det en rearrangering av immunoglobulin-genuttrykk i tillegg til at forskjellige immunoglobuliner og CD-markører kommer til uttrykk på celleoverflaten. CD-markører som er karakteristiske for en pre-B-celle er de samme som for en pro-B-celle, men

de har i tillegg et svakt CD20-uttrykk. I en pre-B-celle finnes tunge kjeder av typen immunoglobulin klasse M (IgM), og i tillegg er cytoplasmatisk immunoglobulin (cIg) uttrykt.(3) Et immunoglobulin er bygd opp av lette og tunge kjeder. (5) De tunge kjedene dannes først, og de lette kjedene dannes senere i differensieringen. Ved neste modningstrinn, når pre-B-cellen er utviklet til en umoden B-celle, har den i tillegg til cIg også dannet overflateimmunoglobuliner som er både tunge og lette kjeder av klassen IgM.(3) De lette kjedene er enten av typen kappa eller lambda. (4) En B-lymfocyt kan normalt kun utvikle enten kappa eller lambda. Fordelingen mellom disse to typene, kalt kappa/lambda-ratio er omtrent 50/50 for B-lymfocytter hos friske pasienter. (2) Til forskjell fra tidligere steg har ikke en umoden B-celle CD38 eller CD10 uttrykt på overflaten, men de har sterkere uttrykk av CD20. Dette er siste trinn ved differensiering i beinmargen, og B-cellen vil gå over til perifert blod for å fortsette differensieringen til en moden B-lymfocyt. (3)

B-cellene vil differensieres videre i perifert blod og i primære lymfoide follikler. Ved overgang fra beinmargen utvikles B-cellen til en moden, naiv B-celle. De naive B-cellene har utviklet immunoglobulin D (IgD) i tillegg til IgM på celleoverflaten. Karakteristiske CD-markører for en naiv B-celle er CD19, CD79 α og CD20. Når en naiv B-celle støter på et antigen som passer deres overflateimmunoglobulin-reseptor gjennomgår den naiv B-cellen transformasjon, proliferasjon og til slutt blir den en moden antistoffsekreterende plasmacelle eller en hukommelsecelle. Naive B-celler kan enten utvikle seg til en plasmacelle med kort levetid, via en eksfollikulær B-blast ved en T-celleuavhengig modning, eller gå inn i det germinale senteret (GS) i en follikkel. I GS gjennomgår B-cellen en somatisk hypermutasjon og klassebytte av immunoglobulin tunge kjeder fra IgM og IgD til immunoglobulin G (IgG) og immunoglobulin A (IgA). Den transformerte cellen i GS, kalt sentroblast, vil utvikle seg til en sentrocytt. Sentroblaster og sentrocytter gjenkjennes på bakgrunn av CD-markørene CD19, CD10, CD38 og CD20. Celler som går ut av GS utvikles til plasmaceller med lang levetid eller hukommelsesceller. Karakteristisk for hukommelsesceller er uttrykk av CD-markørene CD19, CD79 α , CD20 og svakt uttrykk av CD38. Plasmacellene karakteriseres ved uttrykk av CD-markørene CD19, CD79 α og CD38. (3)

Pro-B	Pre-B	Umoden B-celle	Moden Naiv B-celle	Sentroblast og sentrocytt	Hukommelsescelle	Plasmacelle
			CD45			
			CD19			
CD10				CD10		
			CD79 α			
CD38				CD38		CD38
			CD20			

Figur 1: Uttrykk av CD-markører ved forskjellige differensieringstrinn under utviklingen av en B-lymfocyt. Sterkere farge indikerer sterkere uttrykk av markøren.

1.1.2. Patogenese

KLL er en blodsykdom som skyldes uhemmet produksjon av lymfocytter, med celler som viser stor heterogenitet. Dette kan sees ved cellenes fenotypiske egenskaper, mutasjon i den variable delen av den tunge kjeden i immunoglobulinet, immunoglobulin heavy chain variable (IgHV), og ved kromosom- og genforskjeller. Med utgangspunkt i cellenes overflatemembranfenotype og genuttrykk er det enighet om at sykdommen stammer fra B-lymfocytterne. Det er likevel usikkerhet knyttet til patogenesen til KLL. Det uklare ved patogenesen er om KLL-cellene stammer fra én enkelt, eller flere B-lymfocytforløpere og ved hvilke stadier i differensieringen av B-lymfocytterne de utvikles. (6)(7)

For å finne forløpere(n) til KLL-celler har det blitt forsket på ulikheter mellom KLL-celler og normale B-lymfocytter. KLL-cellene uttrykker overflate- og cytoplasmatisk IgM og IgD, og lavere verdier av IgG og IgA. Dette betyr at de ikke har nådd differensieringstrinnet der de gjennomfører et bytte av immunoglobulin-klasser. Enzymatisk innhold i KLL-celler hjelper også for å forstå dannelsesstadiet. Enzymene terminal deoksynukleotidyltransferase og plasmamembranenzymet 5'-nukleotidase plasserer opprinnelsessted for KLL-cellene i et trinn mellom en pre-B-celle og en moden B-lymfocyt. (7)

Det er hos 60% av alle KLL-pasienter påvist en mutasjon i B-cellereseptoren. Disse KLL-cellene ser ut til å ha gjennomgått modning i GS i en lymfeknute, og fått en somatisk hypermutasjon i IgHV. (8) Dette betyr at KLL-cellene i disse tilfellene har vært utsatt for et

antigen under differensieringen av B-lymfocytene. KLL-celler med mutert IgHV stammer fra B-celler som har blitt eksponert for antigen, og KLL-celler med umutert IgHV stammer fra naive B-celler. Basert på denne informasjonen ble det foreslått at KLL ikke er én sykdom, men to separate sykdommer som oppstår ved forskjellige differensieringstrinn av B-lymfocytene. I tillegg til å ha KLL-pasienter med B-lymfocytter som ser ut til å stamme fra disse to differensieringstrinnene, finnes det KLL-pasienter med B-lymfocytter som ikke passer inn i disse subklassene. Det finnes også KLL-pasienter som har likheter med begge to. (8)(9)

Hos omtrent 80% av pasienter diagnostisert med KLL er det funnet kromosomavvik. Det mest vanlige kromosomavviket funnet blant KLL-pasienter er defekt i kromosom 13 (del13q14). Denne defekten påvirker regulering av apoptose av B-lymfocytene og cellyklusen deres. Det er blitt funnet flere kromosom- og genmutasjoner som kan føre til KLL, men det er også en andel KLL-pasienter som ikke har et påvist gen- eller kromosomavvik. (7)(8)

Et mulig forstadium til utvikling av KLL er monoklonal gammopati. Dette er en tilstand der pasienten har monoklonal B-cellelymfocytose (MBL). (1) Tilstanden har usikker klinisk betydning, men er sett på som et forstadium til KLL. MBL utvikler seg ikke til KLL i alle tilfeller, men kan utvikle seg videre til andre sykdommer eller ikke ha klinisk betydning for pasienten i det hele tatt. (10) MBL vil også kunne observeres hos friske personer. Blant antatt friske personer over 50 år er det omtrent 3 % som har fått påvist tilstanden.(1)

Det er gjort studier for å finne miljøfaktorer som kan gi økt disposisjon for utvikling av KLL hos en person. Det er flere mulige miljøfaktorer som kan knyttes til utvikling av KLL, der den mest dokumenterte er pasientenes genetiske anlegg for KLL. (2) Pasientenes genetiske anlegg er studert i sammenheng med familiær forekomst av lymfoproliferative sykdommer eller annen hematologisk malignitet, ved populasjonsregistrering og ved tvillingstudier. (11) Studiene av miljøfaktorer viste at familiær forekomst av en hematologisk malignitet gir en økt disposisjon for utvikling av KLL. En studie, gjort på et stort antall pasienter med KLL studert opp mot kontrollgrupper, har funnet flere miljøfaktorer som er assosiert med tilstedeværelse av KLL. Disse var familiær forekomst av hematologisk malignitet, å leve eller jobbe på gård, å jobbe som frisør, og infeksjon med hepatitt C. Miljøfaktorer som har vist seg å gi en beskyttelse mot utvikling av KLL er blodtransfusjon, eksponering for sol, røyking og dersom en person har mange allergier. Resultater fra andre mindre studier viser at kronisk

eksponering for elektromagnetiske felt, og eksponering for stråling også kan øke en persons disposisjon for KLL. (2)

1.1.3. Diagnostisering

Pasienter som får påvist KLL har ofte ingen symptomer ved diagnosetidspunkt. KLL er en kronisk sykdom som utvikler seg langsomt over en lengre periode. Mulige symptomer ved KLL er forstørrede lymfeknuter, hepatosplenomegali og generelle kreftsymptomer som blant annet tretthet, nattesvette og vekttap. (12) Ettersom mange av pasientene ikke har noen symptomer er det ikke uvanlig at personer med KLL har utviklet sykdommen lenge før de merker noe til den. Mange pasienter blir diagnostisert ved en tilfeldighet, ofte ved omstendigheter der det utføres en celledtelling av perifert blod på grunn av noe annet. (13)

Ved mistanke om KLL anbefaler Helsedirektoratet at det skal utføres differensialtelling, blodutstryk og kvantitering av hemoglobin, leukocytter, trombocytter, nøytrofile granulocytter, kreatinin, bilirubin, alkalisk fosfatase, alanin aminotransferase og laktat dehydrogenase (LD) i blodet til pasienten. Dersom funnene fra disse prøvene, og fra klinisk undersøkelse av pasienten gir begrunnet mistanke om KLL, blir pasienten henvist til pakkeforløp for KLL. (14)

I pakkeforløpet for KLL blir det ved diagnostisering analysert antall leukocytter, den karakteristiske morfologien til leukocytene ved mikroskopi av blodutstryk, og det blir gjort en immunfenotyping av cellene. For å kunne stille diagnosen må det være påvist lymfocytose, og det må påvises $\geq 5 \cdot 10^9/L$ B-lymfocytter i perifert blod. Cellenes karakteristiske morfologi ved KLL er små, modne lymfocytter med lite cytoplasma og en tett kjerne uten synlig nukleol og delvis aggregert kromatin. Det kan også observeres B-lymfocytter med kjerneskygger, kalt Gumprechtske kjerneskygger. (15) 15% av pasienter med KLL vil ikke ha disse morfologiske kjennetegnene. I disse tilfellene vil en større andel umodne lymfocytter være tilstede, og det vil derfor også være viktig med immunfenotyping ved diagnostisering. (13) Ved immunfenotyping undersøkes CD-markørene på leukocytene. Ved KLL kommer karakteristiske CD-markører til uttrykk på celleoverflaten til B-lymfocytene. CD-markørene benyttes ved diagnose av KLL og B-lymfocytene må ha det karakteristiske immunfenotypiske uttrykket for at diagnosen skal bli satt.

Selv om KLL betegnes som én sykdom, er det en heterogen sykdom der flere forskjellige molekylære abnormaliteter kan være uttrykt. Det finnes ingen gullstandard for immunfenotyping ved mistanke om KLL, men i et prosjekt gjort av The International Clinical

Cytometry Society (ICCS) ble det undersøkt hvilke markører som er hensiktsmessige ved diagnostisering av KLL.(16) Studien konkluderte med at immunfenotyping minimum bør omfatte undersøkelse av markørene CD19, CD5, CD20, CD23, kappa og lambda ved diagnose av KLL. Ved differensialdiagnostisering, for å skille KLL fra andre lymfoproliferative sykdommer, vil det også være hensiktsmessig å undersøke andre markører. Studien anbefalte undersøkelse av CD43, CD79 β , CD81, CD200, CD10 og receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1 (ROR1) ved differensialdiagnostisering. (16)

Ved diagnose av KLL benyttes immunfenotyping til å gi ut en KLL-skår. KLL-skåren inkluderer undersøkelse av markørene CD5, CD23, CD22 eller CD79 β , CD200, kappa og lambda som minimum ved immunfenotyping ved KLL diagnostisering. Ved å undersøke B-lymfocyttenes uttrykk av disse markørene utledes det en KLL-skår basert på tallene i tabell 1. Hver markør gir en verdi på 1 eller 0 i henhold til om markøren er typisk eller utypisk for KLL. Sammenlagt vil disse poengene gi en skår mellom 0 og 5, der 5 er typisk ved KLL og 0 er utypisk ved KLL. I omtrent 90% av tilfellene der pasienten har KLL får pasienten en skår på 4-5. Noen pasienter med KLL har lavere skår, og det er omtrent 6% og 2% av pasientene som har en skår på henholdsvis 3 og 1-2. (1)

Tabell 1: Tabellen viser uttrykk av markører ved immunfenotyping. Hvor sterkt markørene er uttrykt sammenliknes med typisk uttrykk ved KLL. Hver markør gir en skår på 0 eller 1 ut fra typisk eller utypisk uttrykk i henhold til KLL. Summering av markør-skårene resulterer i en KLL-skår. Tabell hentet fra Nasjonalt handlingsprogram med retningslinjer for diagnostikk, behandling og oppfølging av maligne blodsykdommer, utarbeidet av Helsedirektoratet (tabell 7.1).

Markør	Typisk KLL(skår)	Andre B-celle leukemier/lymfomer (skår)
Membran Ig (Kappa/lambda)	Svak (1)	Moderat/sterk (0)
CD5	Positiv (1)	Negativ (0)
CD23	Positiv (1)	Negativ (0)
CD79 β eller CD22	Svak/negativ (1)	Moderat/sterk (0)
CD200	Positiv (1)	Negativ (0)

Ved undersøkelse av immunfenotypisk uttrykk, blir det i tillegg til KLL undersøkt for andre lymfoproliferative sykdommer dersom en pasient har lymfocytose. Mantelcellelymfom, marginalsonelymfom, follikulært lymfom, lymfoplasmatisk lymfom og hårcelleleukemi er andre lymfoproliferative sykdommer som kan være årsak til lymfocytose hos en pasient. Forskjellige immunfenotypiske uttrykk gjør seg gjeldende ved forskjellige lymfoproliferative sykdommer, og ved bruk av immunfenotyping og KLL-skår kan KLL skilles fra andre lymfoproliferative sykdommer. (14) Ved mantelcellelymfom uttrykker pasientens

lymfocytter, i likhet med KLL, markøren CD5, men derimot ikke markøren CD23. I tillegg har lymfocytene et høyere uttrykk av CD79 β . For pasienter med hårcelleleukemi uttrykker lymfocytene markørene CD11c, CD25 og CD103, som er utypiske hos en typisk KLL-pasient. Pasienter med follikulært lymfom har lymfocytter som ofte uttrykker markørene CD10, CD20, CD22 og CD79 α , men ikke CD5 eller CD23 som er vanlig ved KLL. Pasienter med marginalsonelymfom og lymfoplasmatisk lymfom har lymfocytter som uttrykker markørene CD19 og CD20, men ikke markørene CD5 og CD23. (2) Immunfenotypisk uttrykk gitt som en KLL-skår gjør det på denne måten enklere å skille mellom forskjellige lymfoproliferative sykdommer.

Andre undersøkelser som kan benyttes ved diagnostisering av KLL er undersøkelse av beinmargsapsirat, full blodcelletelling, proteinelektroforese, direkte antiglobulin test og kvantitering av haptoglobin, kreatinin, urinsyre, bilirubin, LD og transaminaser. Ved diagnostisering av KLL benyttes også stadieinndeling for å beskrive prognose og tumorvolum. I Norge og resten av Europa benyttes Binet-Rai klassifikasjonssystemet. Dette ble utviklet på 70-tallet og er basert på kliniske vurderinger av tumorvolum og grad av leukemisk beinmargaffeksjon, uttrykt som anemi eller trombocytopeni. (1) (8)

Det kombineres mange analyser ved mistanke om KLL. Analysing av antall leukocytter, undersøkelse av morfologien til cellene, og immunfenotyping av cellene er de viktigste analysene, og det er disse som kreves for sikker diagnostisering av KLL i dag. KLL er en kompleks sykdom og det er fremdeles usikkerhet knyttet til patogenesen. Dette gjør diagnostisering og behandling av KLL-pasienter mer utfordrende.

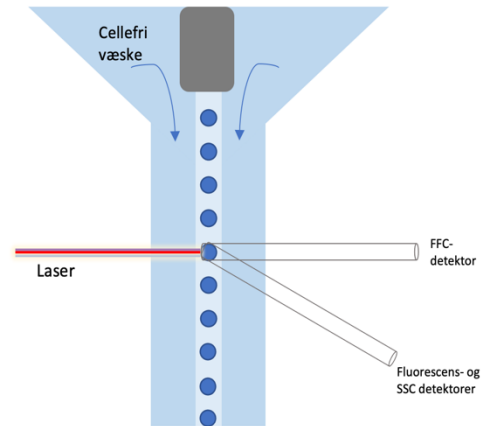
1.1.4. Behandling

Behandling av pasienter diagnostisert med KLL avhenger av kreftutviklingen hos hver enkelt pasient. Mange pasienter som får påvist KLL er asymptomatiske fordi diagnosen er blitt stilt som følge av at lymfocytose ble påvist ved en tilfeldighet. Asymptomatiske pasienter blir sjelden gitt behandling. Indikasjoner på at pasienten trenger behandling er tegn på progressiv beinmargssvikt, massiv eller progressiv lymfeknutesvulst, massiv eller progressiv splenomegali og progressiv lymfocytose, i tillegg til allmenne symptomer som vekttap og feber i mer enn to uker. (1) Behandling av symptomatiske pasienter kan innebære en kombinasjon av kjemoterapi og antistoff som er spesifikke for pasientens leukemiceller. (14) Førstelinjebehandling for pasienter over 65 år som er i god form er gjerne fludarabin, cyklofosamid og rituximab (FCR). Pasienter som er over 65 år, og samtidig har god

funksjonsstatus vil bli gitt bendamustine og rituximab (BR), mens pasienter med dårligere funksjonsstatus vil få klorambucil i kombinasjon med anti-CD20 antistoff. (1)

1.2. Flowcytometri

Flowcytometri er en metode som i diagnostikken benyttes til å kvantitere enkeltceller og diskriminere mellom enkeltkomponenter. Dette gjør det mulig å identifisere og få informasjon om små undergrupper av celler i en heterogen populasjon. (17) Cellene som analyseres på et flowcytometer må befinne seg i en suspensjon som enkeltpartikler. Ved analysen ledes cellene enkeltvis gjennom en flowcelle som vist i figur 2. Cellesuspensjonen tilsettes i en cellefri væske kalt bærevæske som trekker cellene gjennom flowcellen slik at cellene legger seg sentralt og enkeltvis i væsken, og kan telles én og én. Flowcellen bestråles av en laser. Når en celle passerer laseren, vil lyset spres i forskjellige vinkler og registreres av detektorer. Detektorene er plassert slik at det kan måles forward scatter (FSC) og side scatter (SSC). FSC gir oss informasjon om cellens størrelse, mens SSC gir oss informasjon om cellens granularitet. Informasjonen om enkeltcellens størrelse og innhold benyttes til å presentere cellene i et todimensjonalt plot kalt flowcytogram, med henholdsvis FSC og SSC på x- og y-aksen. Informasjonen fra dette plotet kan brukes til å gruppere ulike typer celler med lik størrelse og granularitet. Det vil dannes populasjoner i plotet som vil bestå av samme celledtype. (18)



Figur 2: Flowcelle som viser at cellene trekkes gjennom cella enkeltvis og bestråles av laser, slik at lyset som er spredt og emittert kan måles av detektorer.

1.2.1. Immunfenotypisk flowcytometri

Flowcytometrisk metode kan utvides til andre, mer spesialiserte metoder. Immunfenotyping er en slik metode. Ved immunfenotypisk flowcytometri benyttes det monoklonale antistoff konjugert med fluorokromer. Antistoffkonjugatene benyttes blant annet i medisinske laboratorier for å påvise CD-markører som uttrykkes på leukocytter, og kan benyttes for å skille mellom ulike celledinjer. I tillegg til dette kan det påvises CD-markører som forteller noe om hvor stor grad en celle er blitt differensiert. Dette vil være beskrivende for om en pasient har normalt utviklede celler. Fluorokromene som er konjugert til antistoffene, er stoffer som vil sende ut emisjonslys ved bestråling med eksitasjonslys. (19) Når prøven, hvor antistoffkonjugatet er bundet til en markør på en av cellene, sendes gjennom flowcellen, bestråles den med laserlys, og elektronene i fluorokromet eksiteres. Energien fra laserlyset

absorberes, og elektronene eksiteres til et høyere energinivå. Når elektronene i fluorokromet faller tilbake til grunntilstand vil energien sendes ut som fluorescerende lys som vist i figur 3. Fluorokromet emitterer lys med spesifikke bølgelengder som detekteres av detektorer i flowcytometeret. (20)

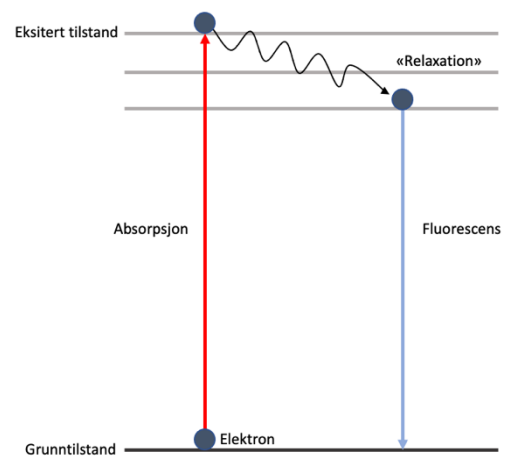
Immunfenotypisk flowcytometri har blitt et viktig verktøy ved diagnostisering og klassifisering av hematologiske sykdommer. Paneler og rør er etablerte og benyttes ved mistanke om forskjellige hematologiske sykdommer. Et analyserør inneholder

antistoffkonjugater som vil bindes til markører som befinner seg på celler fra forskjellige cellelinjer og underliggende subklasser. Et panel er et eller flere analyserør for screening, eller for deteksjon av spesifikke celletyper og hematologiske diagnoser.

1.2.2. Innstilling av flowcytometeret

To av flowcytometrene som benyttes ved flowcytometrisk immunfenotyping er FACS Canto II eller FACSLyric (BD Biosciences). Dette er flowcytometre som sender laserlys med tre forskjellige bølgelengder gjennom flowcellen: 488nm, 633nm og 405 nm på FACSCanto II og 488nm, 640nm og 405nm på FACSLyric. Altså sendes det blått, rødt og fiolett laserlys gjennom flowcellen. Når prøven er blitt bestrålt med laserlyset vil det sendes ut lys som både er blitt spredd av cellene og emittert lys fra fluorokromene. FSC måles ved hjelp av den blå laseren og en fotodiode, og de resterende fluorescensparametrene, inkludert SSC måles av fotomultiplikatorrør som er ordnet i et oktagon og to trigon. Hvilken detektor som velges til å detektere lyset som er sendt ut avhenger av hvilket fluorokrom som benyttes, da hvert fluorokrom sender ut emitterende lys med karakteristisk bølgelengde. Informasjonen fra detektorene kan benyttes til å sette opp flowcytogram der det er mulig å skille mellom de forskjellige cellene basert på hvilke fluorokromkonjugat som har bundet seg til cellen. (21)

For å sikre at detektorene måler fluorokromenes lys på samme måte ved hver måling, må spenningen til detektorene på instrumentet justeres. Denne justeringen sikrer at cellene plasserer seg i plotene i områdene som er ønskelige og forventede. Det finnes, og benyttes flere forskjellige metoder for innstillingen av spenningen til detektorene. EuroFlow har utviklet en Standard Operation Prosedure (SOP), som er basert på bruk av «rainbowbeads»

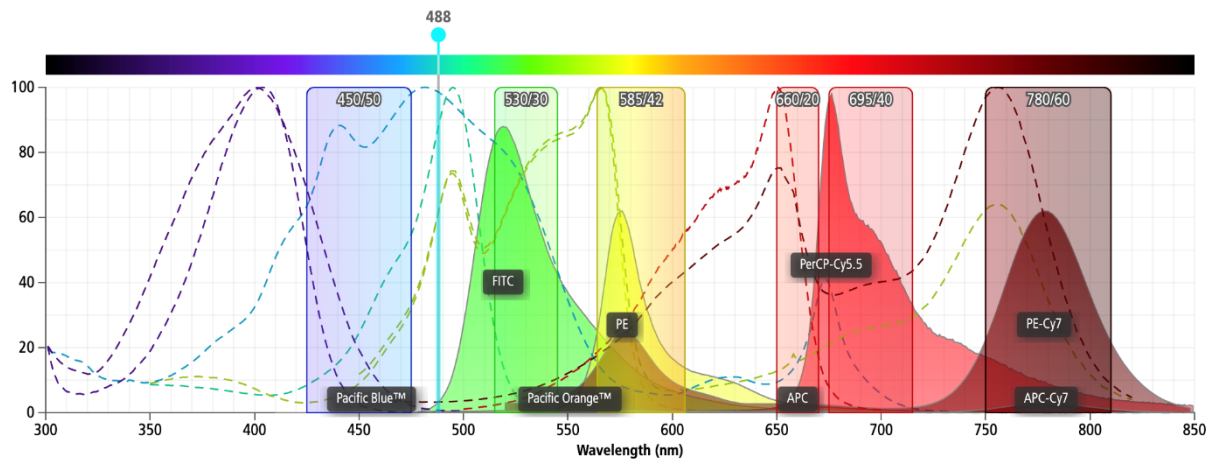


Figur 3: Illustrasjon av eksiteringen av et elektron som sender ut fluorescerende lys ved fall tilbake til grunntilstand

med bestemte fasitverdier, for både for FacsCanto II og FACSLyric. Spenningen blir ved innstilling justert opp eller ned slik at signalet blir sterkere eller svakere, og cellepopulasjonene i flowcytogrammene plasserer seg i ønsket område.

I dag finnes det mange ulike fluorokromer, og de benyttes i stor grad i kombinasjoner. Ved analyse av prøver fra pasienter som skal utredes for lymfoproliferative tilstander, tilsettes det gjerne åtte fluorokrom-antistoffkonjugater til én prøve. Hvilke fluorokromer som benyttes avhenger blant annet av fluorokromenes intensitet, og hvor sterkt uttrykket av markørene som skal påvises er på cellene. En celle som uttrykker flere av markørene som er tilsatt til røret, vil emittere lys ved flere bølgelengder. Disse er spesifikke for hvert fluorokromkonjugat som er bundet til cellen. Ved immunfenotypisk flowcytometri der det benyttes flere fluorokromer i én prøve er det viktig at fluorokromene emitterer lys med spesifikke bølgelengder som detekteres av ulike detektorer. Før fluorescenslys detekteres, sendes det gjennom speil- og filtersystemer, hvilket er essensielt for at lys fra flere fluorokromer skal kunne detekteres samtidig. (17) Utviklingen av immunfenotypisk flowcytometri, og økningen i bruk av flere fluorokromkonjugater hindres av at flere av fluorokromene som er tilgjengelige i dag har fluorescensspekter som overlapper hverandre. Denne spektrale overlappingen kalles «spillover». Dersom det ikke blir gjort noe for å kompensere for «spillover» mellom fluorokromene, kan en konsekvens være at det blir gitt ut falskt positive svar.

Ved innstillingen av instrumentet må det sikres at eventuell «spillover» mellom fluorokromene påvirker resultatene i liten grad. Fra et fluorokrom vil det emitteres lys som måles av den tiltenkte detektoren for dette fluorokromet, men noe lys vil også være i samme spektrale område til en detektor som er tiltenkt et annet fluorokrom. Dette er vist i figur 4 der eksempelvis et signal mellom 550nm og 600nm inneholder emisjonslys fra både phycoerytrin (PE), PE-Cyanin7 (PE-Cy7) og fluoresceinisotiocyanat (FITC), selv om det kun er lyset fra PE som er ønskelig her. Fordi at det kun er PE som er ønskelig i dette området, vil lyset som kommer fra FITC og PE-Cy7 bli trukket fra ved hjelp av kompensering. (22) For å hindre at «spillover» får en konsekvens for resultatet, må det spektrale overlappet mellom fluorokromene kalkuleres. Det kalkulerte spektrale overlappet kan benyttes for å matematisk kompensere for «spillover» i en detektor ved at dette trekkes fra resultatet. Dersom det blir kalkulert et for lavt spektralt overlapp vil det kunne skje en underkompensering der det blir gitt ut falskt positive svar, og dersom det blir kalkulert et for høyt spektralt overlapp vil det kunne føre til overkompensering, som kan bli gitt ut som falskt negative svar. (17) (23)



Figur 4: Spektralt overlapp mellom emisjonslys fra ulike fluorokromer ved bruk av eksitasjonslys på 488nm. Figur er hentet fra BD Bioscience Spectrum viewer (21)

1.2.3. Antistoff og antistofftitrering

Ved immunfenotyping benyttes polyklonale eller monoklonale antistoff, konjugert med forskjellige fluorokromer for å detektere bestemte markører på en celle. Antistoff er proteiner som kan gjenkjenne og binde bestemte molekyler som kalles antigener. Polyklonale antistoff er spesifikke for flere antigener. Disse fungerer bra ved enkelte immunologiske testsystemer, men ved andre immunologiske teknikker vil bruk av polyklonale antistoffreagenser kunne medføre en del uspesifikke interaksjoner som fører til maskering av det spesifikke signalet. På grunn av dette ble det også utviklet monoklonale antistoff med definert spesifisitet mot ett antigen. Denne spesifisiteten gjør at disse er bedre egnet til bruk i flowcytometrisk immunfenotyping der det skal påvises spesifikke antigen på celleoverflaten. Ved flowcytometrisk immunfenotyping er det derfor vanligst å benytte monoklonale antistoff. (17)

For å finne ut mengden monoklonale antistoff som skal benyttes ved en flowcytometrisk immunfenotyping benyttes antistofftitrering. Antistofftitrering har som formål å finne optimal mengde og konsentrasjon av monoklonale antistoff, konjugert med et fluorokrom, som benyttes ved merking av antigener uttrykt på overflatemembranen til levende celler. (24)

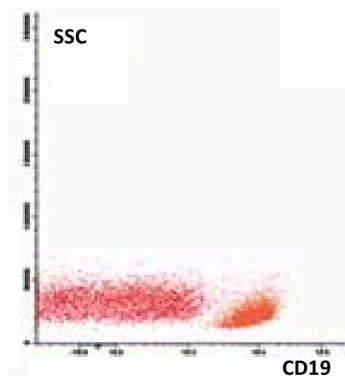
Antistofftitrering gjøres ved å titrere antistoffløsninger med stigende konsentrasjon, mot en løsning med celler. Optimalt resultat ved en antistofftitrering gir et tydelig skille mellom en positiv og en negativ reaksjon. I tillegg innebærer et optimalt resultat at det er så få uspesifikke bindinger som mulig. Dersom antistoffkonsentrasjonen er for høy vil det kunne oppstå uspesifikke bindinger mellom antistoffene og celler som ikke uttrykker tilhørende antigen. Altså kan en for høy antistoffkonsentrasjon føre til falskt positive svar. Ved for lav

antistoffkonsentrasjon vil det være vanskelig å skille ut de positive cellene i flowcytogrammene som benyttes ved gating, fordi mange av antigenene som uttrykkes på cellene ikke har antistoffkonjugat bundet til seg. For å få et tydelig skille mellom de positive og negative populasjonene i flowcytogram ved flowcytometrisk immunfenotyping er det derfor viktig å finne optimal konsentrasjon av antistoffkonjugatene. Antistofftitreringen kan utføres av produsenten av antistoffet, eksterne laboratorier, eller lokalt på sykehuslaboratoriet som skal benytte seg av antistoffene. (24)

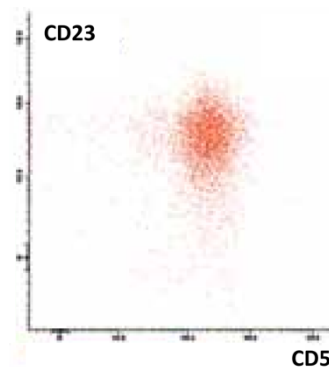
1.2.4. Gating

Tolkning av resultatene fra en flowcytometrisk immunfenotyping gjøres i flowcytogram ved bruk av en teknikk som kalles gating. Gating har som formål å sortere ut cellepopulasjoner, og blir gjort basert på målesignaler fra celler som har like egenskaper. Cellene som uttrykker de samme markørene, plasserer seg samlet i populasjoner i flowcytogrammet. I flowcella vil alle celler som passerer laserstrålen spre, og eventuelt emittere, lys. Signalene som detekteres blir presentert i flere forskjellige flowcytogram. For en KLL-diagnose er det interessant å skille ut B-lymfocytene, og for å finne disse cellene benyttes det linjemarkører. For B-lymfocytene blir CD19 brukt som en slik markør da denne uttrykkes på B-lymfocytene i alle stadier i utviklingsprosessen. Cellene som har et sterkt uttrykk av CD19 vil plassere seg til høyre i cytogrammet der CD19-uttrykk står på x-aksen og SSC på y-aksen som vist i figur 5. (25) I tillegg til dette flowcytogrammet benyttes flere andre flowcytogram med markører, som er tilstede i røret og som uttrykkes på cellene, på enten x- eller y-aksen. Markører som er relevante ved diagnose av KLL, og som det er interessant å se på B-lymfocytens uttrykk av, er særlig de markørene som inngår i KLL-skåren.

Etter at B-lymfocytene er blitt definert, blir markører som er relevante for KLL-diagnostikk satt på aksene, og cellene blir definert på bakgrunn av hvilken grad de uttrykker markørene. For eksempel undersøkes B-lymfocytens uttrykk av CD5 og CD23. Ved sterkt uttrykk av begge markørene, som vist i figur 6, forsterkes mistanken om KLL. Informasjonen om



Figur 5: Flowcytogram som viser lymfocytters uttrykk av CD19 hos en pasient med KLL. Figur tilpasset, og hentet fra Fenstad MH, Rø AD. Flowcytometri i klinisk praksis.



Figur 6: Flowcytogram som viser B-lymfocytters uttrykk av CD5 og CD23 hos en pasient med KLL. Figur tilpasset, og hentet fra Fenstad MH, Rø AD. Flowcytometri i klinisk praksis.

cellenes uttrykk av forskjellige markører vil være bestemmende for diagnosen som blir gitt til pasienten.

1.3.EuroFlow

EuroFlow er en internasjonal organisasjon som er støttet av Europakommisjonen som et «Specific Targeted Research Project» (STREP). Organisasjonen har utviklet standardiserte prosedyrer og paneler for immunfenotyping ved diagnose av maligne hematologiske tilstander. EuroFlow består av mer enn 20 forskergrupper innen hematologi og en mindre bedrift. Alle disse regnes som eksperter innen flowcytometri. (26)

I 2006 startet EuroFlow et prosjekt der målet var å innovere og standardisere immunfenotyping av 8-color flowcytometri for å sikre sammenliknbare resultater mellom forskjellige laboratorier ved diagnose av maligne, hematologiske tilstander. Dette ble oppnådd ved utarbeidelse av standardiserte prosedyrer og antistoffpaneler. Prosjektet ble startet fordi det ikke fantes standardiserte prosedyrer fra før av, og fordi at dette var et fagfelt i utvikling med økt kvalitet på instrumenter, og økt tilgang på gode fluorokromer og antistoff.

Utviklingen førte med seg at medisinske laboratorier utarbeidet forskjellige metoder for diagnostikk av pasienter med samme problemstilling. Dette gjorde at sammenlikning av resultater mellom laboratoriene ble vanskelig. Metodene som ble benyttet var basert på det eksperter innen feltet mente var best, men disse hadde derimot aldri blitt validert. En følge av dette kunne dermed være at kvaliteten på resultatene varierte mellom ulike laboratorier. At EuroFlow utviklet prosedyrer basert på det som allerede var innarbeidede rutiner på flere laboratorier, og sikret at disse metodene var reproducerbare, var derfor et viktig steg for å sikre kvaliteten på prøvesvar som ble gitt av laboratorier som drev med flowcytometrisk immunfenotyping. (27)

EuroFlow utviklet standardiserte prosedyrer med hensyn til instrumentinnstillinger, fluorokromsammensetninger og prøvebehandling. I tillegg fokuserte de på å utvikle en programvare som kunne brukes til å evaluere antistoffreagens og antistoffpanel. Videre presenterte EuroFlow også paneler som benyttes for å diagnostisere pasienter med hematologiske sykdomstilstander. Prosedyrene og panelene til EuroFlow ble utviklet med utgangspunkt i erfaringer fra laboratoriene som er en del av EuroFlow. Enkelte punkter ved prosedyrene og panelene ble eksperimentelt utprøvd, mens andre ble basert på datamateriale som allerede eksisterte.

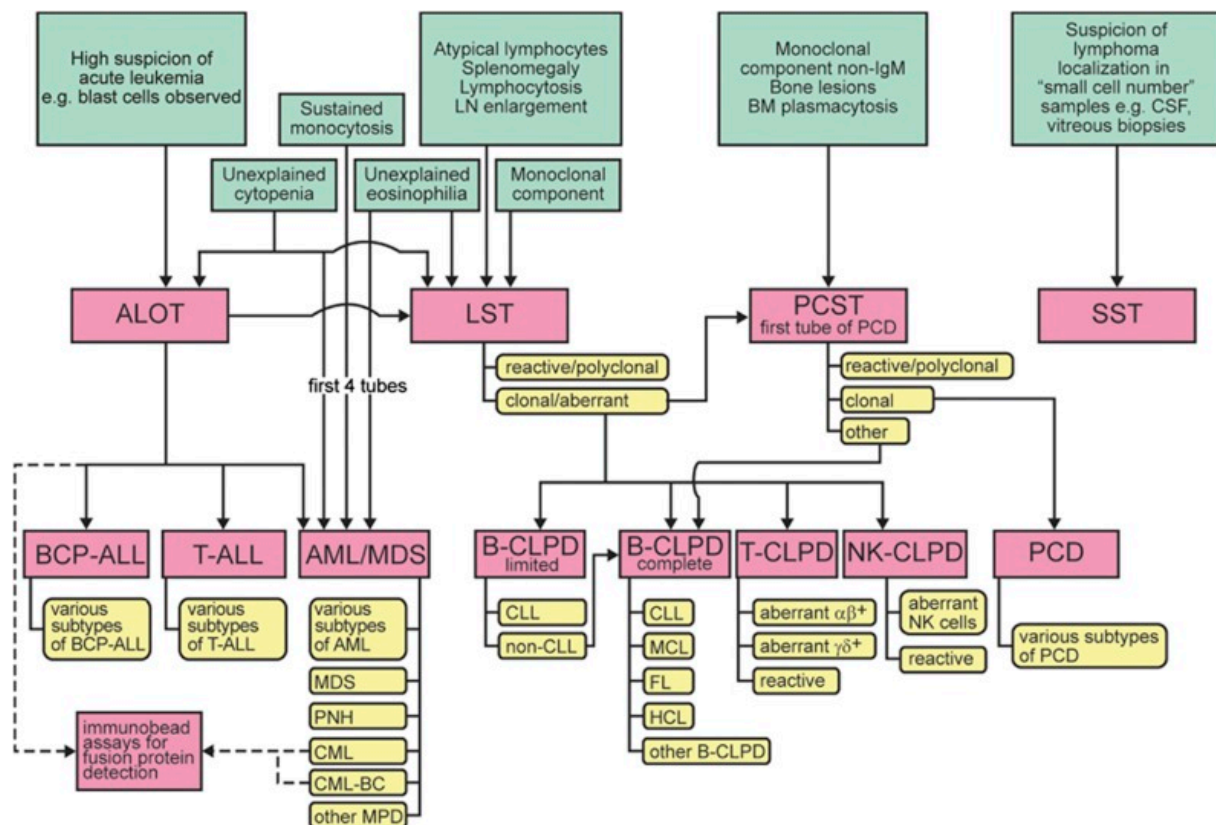
Ved valg av hvilke fluorokromer som var gode nok til å brukes i et 8-color panel var det viktig å se på fluorokromenes emisjons- og eksitasjonsspekter, relative lysstyrke, stabilitet og fluorokromets «spillover» til andre kanaler. EuroFlow valgte noen av fluorokromene basert på tidligere erfaring og kunnskap, mens andre fluorokromer ble utprøvd før disse kunne anbefales som gode fluorokromer. I et 8-color panel benyttes det åtte fluorokromer som skal sende signaler innenfor satte kanaler. Flowcytometeret har åtte kanaler med detektorer som mottar lys fra forskjellige lasere som via speil- og filtersystem kommer fra flowcella. Fire detektorer mottar lys fra den blå laseren, to detektorer fra den fiolette og to fra den røde laseren. Ved valg av fluorokromene som skal benyttes i panelene som er utarbeidet av EuroFlow ble fluorokromer tilhørende de første to detektorene til den blå laseren valgt basert på omfattende erfaring om begge fluorokromer. Disse fluorokromene var FITC og PE. På samme grunnlag ble Allophycocyanin (APC) valgt for den første detektoren til den røde laseren, og enten peridinklorofyllprotein kompleks (PerCP) eller PerCP-Cyanin5.5 (PerCPCy5.5) ble valgt for den tredje laseren. PE-Cy7 ble valgt for den fjerde detektoren til den blå laseren. For den andre detektoren til den røde laseren og de to fiolette laserne var erfaringen med fluorokromene ikke like omfattende, og det ble derfor gjort utprøvinger på aktuelle fluorokromer til disse kanalene. For den andre detektoren til den røde laseren ble APC-Cyanin (APCCy7), Alexa Fluor 700 (AF700) og APC-Hilite7 (APCH7) sammenliknet med hverandre. For den første detektoren til den fiolette laseren ble Pacific Blue (PacB), Horizon V450 (HV450) sammenliknet, og for den siste detektoren ble Pacific Orange (PacO), Anemonia Majano cyan fluorescent protein (AmCyan) og Horizon V500 (HV500) sammenliknet. For å sammenlikne fluorokromene, og for å finne det som fungerte best med tanke på lysstyrke, samspill med de andre fluorokromene, binding til markører og mengde kompensasjon som var nødvendig, ble det brukt mer enn fem blodprøver for alle fluorokromene, og prøvene ble analysert ved åtte av EuroFlow sine laboratorier. Som en følge av resultatene fra analysene valgte EuroFlow å anbefale PacB (eller HV450), PacO (eller HV500), FITC, PE, PerCPCy5.5, PECy7, APC og APCH7 som den beste kombinasjonen av fluorokromer i et 8-color panel.(27)

De standardiserte prosedyrene fra EuroFlow knyttet til prøvebehandling, vasking og merking ble utarbeidet basert på tidligere erfaring og forsøksbasert datamateriale som allerede fantes. Dette datamaterialet kom både fra litteraturen, og fra analyser gjort av egen organisasjon. Euroflow stilte flere krav til prosedyren de utviklet. Disse innebar lav variasjonskoeffisient (CV) for FSC og SSC, at forskjellene mellom gjennomsnittlig fluorescens for FSC og SSC

skulle være store mellom viktige leukocyttopulasjoner, at det var minimalt med celletap og at fluorokromenes lysstyrke ble bevart. Det var også viktig at stabiliteten til fluorkromene ikke ble påvirket av andre fluorokromer, at det var lav grad av bakgrunnsfarging, at forskjellene mellom laboratoriene var minimale og at prosedyren la til rette for enkel og effektiv gjennomførelse av analyse. Resultatet fra denne utprøvingen var at EuroFlow anbefalte å bruke Stain, Lyse, Wash (SLW) som metode for prøvebehandling. SLW innebærer at leukocytterne merkes med antistoff, før erytrocyttene lyses og ubundet antistoff og lyserte erytrocytter vaskes bort. Ved lysering anbefales det bruk av FACS Lysing Solution. I tillegg anbefales det at prøvene må analyseres innen det har gått en time fra siste steg i prøvebehandlingsprosedyren. (27)

En viktig del av arbeidet som ble gjort av EuroFlow var å utarbeide og validere 8-colorpanel som kan benyttes i diagnostikken av pasienter med hematologiske sykdomstilstander. Det har tidligere blitt utviklet og foreslått mange paneler, men disse manglet informasjon om «den beste kombinasjonen av relevante markører i et flerfarget antistoffpanel.» (25) For de diagnostiske laboratoriene var det derfor en viss grad av usikkerhet knyttet til hvordan markørene kunne påvises ved bruk av et flerfarget antistoffpanel. Usikkerheten var særlig knyttet til hvordan ulike fluorokromkonjugater påvirker, og samspiller med hverandre i et større panel fordi at faktorer som fluorescensintensitet kun var utprøvd uten tilstedeværelse av andre fluorokromer. Utvelgelsen av panelets markører ble gjort basert på erfaring fra egne laboratorier, og fra erfaring i litteratur. Panelene kunne derimot ikke kun baseres på erfaring da det fantes en så stor mengde CD-markører, antistoffkloner og fluorokromkonjugater at erfaringen om alle komponentene ikke var bred nok. For at panelene skulle anses som gode og kvalitetssikrede måtte de gjennom flere evalueringsrunder, og testes i stor skala. I evalueringsrundene ble det lagt fokus på om kriterier som fluorescensintensitet også oppnås i kombinasjon med de andre fluorokromene. (25)

Fokuset for de panelene som EuroFlow endte opp med å anbefale var at de skulle passe til behovet for de spesifikke diagnosene som settes ved de flowcytometriske laboratoriene. For å gjøre dette så enkelt som mulig satte EuroFlow opp stegvise paneler som passer til spesifikke diagnoser, se figur 7.



Figur 7: Stegvis paneloversikt hentet fra EuroFlow for diagnose av lymfoproliferative tilstander. I boksene merket med grønt står det kliniske opplysninger hos pasienten, i de rosa boksene opplyses det om hvilke rør som benyttes, og i de gule boksene står det konklusjoner som kan trekkes basert på resultatene fra røret som er analysert.

Basert på informasjonen som oppgis i figur 7 kan et mulig forløp for en pasientprøve hvor det påvises KLL for eksempel være at pasienten har utypiske lymfocytter, splenomegali, lymfocytose og forstørrede lymfeknuter. Da blir prøven satt opp i en lymphoid screening tube (LST). CD-markørene som er i dette røret vil identifisere lymfocytter som er avvikende fra normalt tilstand. Ved funn av avvikende eller klonale B-lymfocytter går prøven videre til B-cell chronic lymphoproliferative disorders (B-CLPD) der det basert på cellenes uttrykk av CD-markører er mulig å gi en KLL-diagnose.

Utvelgelsen av markørene til disse rørene var en prosess som gikk gjennom flere runder med design og evaluering. Fokuset for utviklingen av LST var at det skulle være mulig å detektere avvikende og klonale fenotyper. Røret måtte bestå av linjemarkører som skilte mellom B-, T- og NK-celler, og i tillegg inkludere markører som kunne skille mellom ulike celletyper i disse cellelinjene. Det endelige panelet for LST besto av antistoff mot SmCD3, CD4, CD5, CD8, CD19, CD20, CD38, CD45, CD56, kappa, lambda og T-cellerreseptor $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$). B-CLPD er et panel fra EuroFlow som består av flere rør. Det inneholder fire rør i tillegg til LST. Fra EuroFlow ble det anbefalt at ved en klar mistanke om KLL kan LST-røret benyttes i

kombinasjon med deler av, eller hele, B-CLPD-panelet. Panelet er altså designet på en måte som gjør det mulig å diagnostisere en pasient med KLL på grunnlag av kun de to første rørene i B-CLPD-panelet (25)

1.4. Problemstilling

KLL er den vanligste formen for leukemi i den vestlige verden, og en viktig del av utredningen av KLL-pasienter er flowcytometrisk immunfenotyping. Det finnes i liten grad en standardisert metode for diagnostisering av KLL som alle laboratorier er enige om å bruke ved rutineanalyser.(16) EuroFlow har utarbeidet prosedyrer og paneler i et forsøk på å skape en standardisert metode til bruk ved sykehuslaboratoriene i Europa. Denne prosedyren har laboratoriet ved St. Olavs Hospital benyttet for å utarbeide sine prosedyrer og paneler. Det var ønskelig å kartlegge forskjeller mellom prosedyrene som blir brukt på laboratoriet i Trondheim og standarder ved prøvebehandling utarbeidet av EuroFlow. Ettersom det ikke finnes noen gullstandard for hvordan pasientprøver håndteres ved mistanke om KLL, finnes det også forskjeller i rutineene ved ulike sykehuslaboratorier i Norge som analyserer prøvemateriale fra samme pasientgruppe. Det var derfor også ønskelig å kartlegge hvor store forskjeller det er mellom prosedyrene som blir brukt ved andre sykehuslaboratorier i Norge.

For å skaffe en oversikt over forskjellene ble det valgt følgende problemstilling:

- *Hvordan håndteres pasientprøver ved mistanke om KLL, og hvilke forskjeller er det mellom prosedyrer og paneler som brukes ved sykehuslaboratoriet i Trondheim, andre sykehuslaboratorier i Norge, og standarder som er utarbeidet av EuroFlow?*

2. Materiale og metode

Denne studien er basert på innhenting, prosessering og organisering av informasjon fra skriftlig materiale, og fra observasjoner i laboratoriet. Det ble innhentet informasjon om flowcytometrisk immunfenotyping fra EuroFlow og fra sykehuslaboratoriene i Trondheim, Bergen, Oslo og Tromsø. Informasjonen ble brukt til å sammenlikne ulike fremgangsmåter ved flowcytometrisk immunfenotyping av blod og beinmargaspirat fra pasienter med mistanke om KLL.

2.1. Innhenting av informasjon om flowcytometrisk immunfenotyping

Informasjon om prosedyrer og panel som anbefales av EuroFlow er hentet fra EuroFlows egen nettside. (28) Prosedyrer og panel som benyttes ved St. Olavs Hospital, Enhet for Cytometri ble hentet fra sykehusets kvalitetssystem Extend Quality System (EQS). Prosedyrene fra de andre sykehusene i Norge som utfører flowcytometrisk immunfenotyping ved diagnostisering av KLL ble forespurt og innhentet per e-post fra kontaktpersoner ved laboratoriene: seksjonsleder ved Seksjon for flowcytometri på Haukeland universitetssjukehus, spesialbioingeniør ved Enhet for flowcytometri på Oslo Universitetssykehus og spesialbioingeniør ved Laboratoriemedisin i Tromsø på Universitetssykehuset i Nord-Norge. Prosedyrer og paneler som benyttes på disse laboratoriene, samt opplysninger om hvordan de benyttes ved diagnostikk av KLL ble mottatt fra alle, og ble brukt som grunnlag for å sammenlikne hvordan de ulike laboratoriene går frem ved flowcytometrisk immunfenotyping av KLL. Prosedyrene og panelene som benyttes ved sammenlikning i denne oppgaven, og e-poster med svar fra kontaktpersoner er lagt som vedlegg 1-13.

I tillegg til gjennomgang av prosedyrer, var observasjon på laboratoriet med analysegjennomgang vesentlig for å forstå prosessen en pasientprøve gjennomgår på laboratoriet ved mistanke om KLL. Denne ble gjennomført ved St. Olavs Hospital, Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Enhet for Cytometri. Observasjonen ga en praktisk innføring i arbeidet som blir gjort på laboratoriet. Informasjonen fra denne innføringen ga bedre forståelse av det som blir gjort i praksis med utgangspunkt i prosedyrene og panelene, som senere ble brukt i bearbeidelsen av data.

2.2. Utarbeidelse av sammenlikningstabeller

For sammenlikning av EuroFlows anbefalte prosedyre og paneler, og prosedyrer og paneler brukt ved sykehuslaboratoriene i Trondheim, Bergen, Oslo og Tromsø ble det utarbeidet seks tabeller for sammenlikning:

- Tabell 2: Flowcytometer og innstillinger som benyttes
- Tabell 3: Reagenser som benyttes
- Tabell 4: Prosessen ved forbehandling av prøver før antistoffmerking
- Tabell 5: Prosessen ved merking av prøvematerialet
- Tabell 6: Paneler, rør og fluorokromkonjugater som anbefales av EuroFlow og benyttes av sykehuslaboratoriene
- Tabell 7: Panel, rør og fluorokromkonjugater som benyttes ved utvidet analyse på sykehuslaboratoriet i Tromsø.

I prosedyrene fra de ulike laboratoriene ble det observert små forskjeller i ordvalg og formuleringer selv om alle i praksis gjorde det samme. Det ble derfor tatt en avgjørelse om å bruke standardiserte formuleringer for det som ble vurdert som likt. For lyseringsbuffer og bærevæske ble standardisert ord henholdsvis «BD FACS Lysing Solution (1:10)» og «BD FACS Flow». Vaskebuffer som benyttes ved laboratoriet i Bergen er oppgitt som «EuroFlow SOP vaskebuffer», denne er derfor oppgitt på samme måte som denne oppgis i prosedyren til EuroFlow. Standardisert ord for «blanding» og «fjerning av supernatant» ble henholdsvis «Bland godt» og «Suges av»/ «Dekanter». For opplysning om volum av antistoff, og om antistoff blir tilsatt i blanding av flere eller enkeltvis, ble formuleringer standardisert til «jfr. Panel» og «bruk av antistoffmix» og/eller «bruk av enkeltvise antistoff». For inkubasjonstrinn ble formulering tilknyttet lysforhold standardisert til «lysbeskyttet».

Tabell 6, der panelene sammenliknes, ble utformet med utgangspunkt i panelet til laboratoriet i Trondheim, se vedlegg 4. Denne tabellen tydeliggjorde forskjellene i rørtyper som benyttes ved screening av prøver fra pasienter med mistanke om KLL på de forskjellige sykehuslaboratoriene. Laboratoriet i Tromsø har i tillegg til screeningrør også paneler og rør til utvidet analyse dersom lege får mistanke om KLL hos en pasient ved analyse av screeningrørene. Disse ble også inkludert i sammenlikningen, men satt i en egen tabell, tabell 7.

3. Resultater

Hensikten med denne studien var å kartlegge hvordan flowcytometrisk immunfenotyping gjennomføres som diagnostisk metode ved mistanke om KLL ved fire sykehuslaboratorier i Norge. Dette ble gjort ved å sammenlikne prosedyrene for flowcytometrisk immunfenotyping fra sykehuslaboratoriene i Trondheim, Bergen, Oslo og Tromsø, mot en standard utarbeidet av EuroFlow for prøver fra pasienter der det er mistanke om KLL. Data fra prosedyrer og paneler ble satt opp i seks tabeller (tabell 2 – 7).

Ved alle laboratoriene gjennomgår prøver, som enten er blod eller beinmargsaspirat fra pasienter med mistanke om KLL, flere steg. Blod og beinmargsaspirat gjennomgår en vaskeprosess før leukocytene merkes med antistoff og videre analyseres i et flowcytometer. Data fra flowcytometrisk analyse behandles av leger ved laboratoriene, det stilles en immunfenotypisk diagnose og det gis ut prøvesvar til behandlende lege.

Stegvis fremgangsmåte ved flowcytometrisk immunfenotyping inkluderer:

- Forbehandling før antistoffmerking:
 - Filtrering av beinmargsaspirat
 - Telling av leukocytter i blod og beinmargsaspirat
 - Vasking av blod og beinmargsaspirat
 - Tilsetning av vaskebuffer
 - Blanding
 - Sentrifugering
 - Fjerning av supernatant
 - Resuspensjon
- Merking med antistoff
 - Tilsetning av antistoffkonjugat
 - Tilsetning av lyseringsbuffer for lysering av erytrocytter
 - Blanding
 - Inkubasjon
 - Sentrifugering
 - Fjerning av supernatant
 - Resuspensjon
- Flowcytometrisk analyse
- Gating av analysesvar fra flowcytometrisk analyse

3.1.Sammenlikning av flowcytometer og instrumentinnstilling

Hvilke flowcytometre og instrumentinnstillinger som benyttes ved sykehuslaboratoriene i Trondheim, Bergen, Oslo og Tromsø, og hvilke som er anbefalt av EuroFlow, ble satt opp og sammenliknet i tabell 2. Innstilling av instrument inkluderer blant annet justering av spenning på lasere, og har som hensikt å gi ut best mulig flowcytogram.

Tabell 2: Oversikt over hvilke(t) flowcytometer og tilhørende EuroFlow SOP for instrumentinnstilling som benyttes ved sykehuslaboratoriene i Trondheim, Bergen, Oslo og Tromsø, og hvilke som anbefales av EuroFlow. Innstillinger blir gjort på instrumentene for å få optimale flowcytogram.

	EuroFlow	Trondheim	Bergen	Oslo	Tromsø
Flowcytometer	BD FACSCanto II BD FACS Lyric BD LSRFortessa X-20 BC Navios	BD FACSCanto II og BD FACS Lyric	BD FACSCanto II BD FACS Lyric	BD FACS Lyric	BD FACSCanto II
Instrumentinnstillinger	EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Instrument Setup and Compensation EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Instrument Setup and Compensation BD FACSLyric Instruments Using 8-Color EuroFlow Assays EuroFlow Standard Operating Protocol (SOP) for Instrument Setup and Compensation for BD LSRFortessa X-20 EuroFlow SOP for Instrument setup and Compensation for BC Navios Instruments	EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Instrument Setup and Compensation EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Instrument Setup and Compensation BD FACSLyric Instruments Using 8-Color EuroFlow Assays	EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Instrument Setup and Compensation EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Instrument Setup and Compensation BD FACSLyric Instruments Using 8-Color EuroFlow Assays	EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Instrument Setup and Compensation EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Instrument Setup and Compensation BD FACSLyric Instruments Using 8-Color EuroFlow Assays	EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Instrument Setup and Compensation

Alle sykehuslaboratoriene benytter seg av både flowcytometer og instrumentoppsett som er anbefalt av EuroFlow. Ved laboratoriene i Oslo og Tromsø benyttes henholdsvis BD FACS Lyric og BD FACSCanto II. Ved laboratoriene i Trondheim og Bergen benyttes både BD FACSCanto II og BD FACS Lyric.

3.2.Sammenlikning reagenser og løsninger

Reagensene og løsningene som blir brukt til vasking og lysering av prøvematerialet, samt hvilken bærevæske som benyttes på instrumentene ble sammenliknet, se tabell 3. Reagensene og løsningene anbefalt av EuroFlow er hentet fra «EuroFlow Standard Operation Procedure (SOP) for Sample preparation and staining». Reagenser og løsninger som benyttes ved de forskjellige sykehuslaboratoriene er hentet fra tilsendte prosedyrer laboratoriene selv har utarbeidet.

Tabell 3: Oversikt over reagenser som er anbefalt av EuroFlow og reagenser som benyttes ved sykehuslaboratoriene i Trondheim, Bergen, Oslo og Tromsø ved immunfenotyping. Reagenser benyttet ved vasking og lysing av prøvematerialet, og bærevæske i flowcytometer er inkludert. Forskjeller er farget i blå skrift.

	EuroFlow	Trondheim	Bergen	Oslo	Tromsø
Vaskebuffer	Filtrert PBS (1X) Na ⁺ /K ⁺ + 0,09% NaN₃ + 0,2% BSA og 2mM EDTA pH=7,4	Filtrert PBS (1X) Na ⁺ /K ⁺ + 0,2% BSA og 2mM EDTA pH=7,4 PBS pH 7,3 +/-0,2	Filtrert PBS (1X) Na ⁺ /K ⁺ + 0,09% NaN₃ + 0,2% BSA og 2mM EDTA pH=7,4	Filtrert PBS med 0,2% BSA + 2mM EDTA	BD FACSDiffr
Lyseringsbuffer	BD FACS Lysing Solution (1:10)	BD FACS Lysing Solution (1:10)	BD FACS Lysing Solution (1:10)	BD FACS Lysing Solution (1:10)	BD FACS Lysing Solution (1:10)
Bærevæske	BD FACSDiffr Filtrert PBS + 0,2% BSA + 2mM EDTA	BD FACSDiffr	BD FACSDiffr	BD FACSDiffr	BD FACSDiffr

Ved alle laboratoriene brukes BD FACS Lysing Solution som lyseringsbuffer, som også anbefales av EuroFlow. Som bærevæske anbefaler EuroFlow enten BD FACSTlow eller filtrert PBS uten innhold av NaN_3 . Alle sykehuslaboratoriene benytter BD FACSTlow. I Tromsø benyttes BD FACSTlow også som vaskeløsning. Dette skiller dem fra resterende laboratorier som benytter filtrert PBS (1X) Na^+/K^+ + 0,2% BSA og 2mM EDTA.

Reagensnavn er videre forkortet som «filtrert PBS». EuroFlow anbefaler bruk av filtrert PBS med NaN_3 , denne anbefalingen følger prosedyren til laboratoriet i Bergen. Laboratoriene i Trondheim og Oslo følger ikke anbefalingene til EuroFlow og benytter filtrert PBS uten NaN_3 .

3.3.Forbehandling av prøver før antistoffmerking

Prosedyrer ved forbehandling av blod og beinmargaspirat før merking med antistoff ble sammenliknet ved å sette opplysningene opp i tabell 4. Fremgangsmåte anbefalt av EuroFlow er hentet fra «EuroFlow Standard Operation Procedure (SOP) for Sample preparation and staining», kapittel 2. Fremgangsmåte ved forbehandling av prøver ved sykehuslaboratoriene er hentet fra tilsendte prosedyrer som laboratoriene selv har utarbeidet.

Tabell 4: Oversikt over fremgangsmåte i kronologisk rekkefølge ved preparering av blod eller beinmargaspirat fra pasienter der det er mistanke om KLL. Oversikten er en sammenlikning av prøveprepareringen som er anbefalt av EuroFlow og prøveprepareringen ved sykehuslaboratoriene i Trondheim, Bergen, Oslo og Tromsø. Forkortelse: Leukocytter (WBC).

	EuroFlow	Trondheim	Bergen	Oslo	Tromsø
Holdbarhet og oppbevaring av ubehandlet blod og beinmargaspirat	Ikke beskrevet	Romtemp 18-30 °C 24 timer	Romtemp	Romtemp/kjøleskap	24 timer
Filtrere prøvematerialet Filtertype	Ikke beskrevet	Beinmarg BD Falcon filter 100 µm	Beinmarg BD Falcon filter 30 µm	Ikke beskrevet	Beinmarg Filcons filter 30/50 µm.
Telle WBC før vask	Ikke beskrevet	Blod og beinmarg	Ikke beskrevet	Blod og beinmarg	Blod og beinmarg
Antall vask	3x ved farging av overflateantigen Kappa/Lambda 0x vask ved andre	3x alt prøvemateriale	3x ved farging av overflateantigen Kappa/Lambda 1x vask ved andre	3x ved farging av overflateantigen Kappa/Lambda 2x vask ved andre	2x ved farging av overflateantigen Kappa/Lambda 0x vask ved andre
Prøvemengde som vaskes før antistoffmerking	300 µL	Alt materiale	300 µL	2000-3000 µL	WBC 5-50: 100 µL WBC <5: 200 µL WBC >50: 50 µL
Størrelse og type rør benyttet ved vask	10 mL Falcon rør	50 mL Plastrør	10 mL sentrifugerør fra Heger	15 mL Polypropylenrør	Falcon rør
Mengde vaskebuffer benyttet pr vask	6 mL	Fyll opp til volum er 50 mL	9 mL	Fyll opp rør	2-3 mL
Blanding etter vaskebuffer er tilsatt	Blandes godt	Ikke beskrevet	Blandes godt	Blandes godt	Blandes godt
Sentrifugering: hastighet og tid	540 g 5 min	540 g 5 min, u/brems	540 g 5 min	540 g 5 min	1700 rpm (327 g) 3 min
Fjerne supernatant	Suges av	Suges av	Suges av	Suges av	Suges av
Blanding av cellepellet	Blandes godt	Blandes godt	Blandes godt	Ikke beskrevet	Ikke beskrevet
Resuspensjon etter vask	300 µL vaskebuffer	Ikke beskrevet	300 µL vaskebuffer Mengde vurder ut fra antall WBC	Til opprinnelig volum (2-3 mL)	Ikke beskrevet
Telle WBC etter vask	Ikke beskrevet	Blod og beinmarg	Ikke beskrevet	Ikke beskrevet	Ikke beskrevet

Laboratoriene i Tromsø og i Trondheim har oppgitt samme holdbarhetstid for ubehandlet blod og beinmargsaspirat. Informasjon om oppbevaringen av ubehandlet blod og beinmargsaspirat blir gitt i prosedyrene fra laboratoriene i Trondheim, Bergen og Oslo, der Oslo avviker noe fra de andre, da de i tillegg til å oppbevare prøvene i romtemperatur også kan oppbevare dem i kjøleskap. EuroFlow kommer ikke med anbefalinger om hverken holdbarhet eller oppbevaring av ubehandlede blod- og beinmargsprøver.

Filter benyttes ved sykehuslaboratoriene i Trondheim, Oslo og Tromsø. Filtrene har ulike maskestørrelser. EuroFlow og laboratoriet i Bergen inkluderer ikke filter i sine prosedyrer.

Laboratoriene i Trondheim, Oslo og Tromsø teller antall leukocytter i blod og beinmargsaspirat før prøvematerialet vaskes. EuroFlow og laboratoriet i Bergen inkluderer ikke telling av leukocytter i sine prosedyrer.

Antall vask som blir utført ved laboratoriene er ulikt. Ved laboratoriet i Trondheim blir alle prøver vasket tre ganger. Ved de andre laboratoriene blir det tatt hensyn til om det skal påvises kappa og lambda i prøven. Ved påvisning av kappa og lambda vasker alle laboratoriene blod og beinmargsaspirat tre ganger, med unntak av laboratoriet i Tromsø som vasker to ganger. Euroflow har ingen anbefalinger om vask med mindre kappa og lambda skal påvises. Laboratoriet i Tromsø vasker heller ikke disse prøvene. Ved laboratoriene i Bergen og Oslo vaskes disse prøvene henholdsvis en og to ganger.

EuroFlow anbefaler vask av 300 µL blod eller beinmargsaspirat, dette følges av laboratoriet i Bergen. Ved laboratoriene i Trondheim og Oslo vaskes det et større volum av blod eller beinmargsaspirat. Ved laboratoriet i Tromsø velges volum av blod eller beinmargsaspirat ut fra antall leukocytter.

Størrelse og type rør som benyttes ved vasking av blod og beinmargsaspirat er ulike ved alle laboratoriene.

EuroFlow og alle sykehuslaboratoriene benytter ulike volum vaskebuffer ved vasking av blod og beinmargsaspirat.

Blanding etter tilsetning av vaskebuffer er inkludert i prosedyrene til alle laboratoriene, med unntak av laboratoriet i Trondheim.

Sentrifugeringsinnstilling er lik anbefalingen til EuroFlow ved alle laboratoriene, med unntak av laboratoriet i Tromsø. Laboratoriet i Tromsø sentrifugerer ved en lavere g og i kortere tid. Laboratoriet i Trondheim spesifiserer i tillegg at sentrifuge uten brems benyttes.

Fjerning av supernatant blir gjort likt ved alle laboratoriene.

Blanding av cellepellet er inkludert i prosedyrene til EuroFlow, Trondheim og Bergen, men ikke i prosedyrene til Oslo og Tromsø.

Volum ved resuspensjon anbefalt av EuroFlow og volum benyttet ved laboratoriet i Bergen er like. Laboratoriet i Oslo benytter et annet volum ved resuspensjon. Informasjon om resuspensjon etter vask er ikke beskrevet i prosedyrene til Trondheim og Tromsø.

Ved laboratoriet i Trondheim telles leukocytter både før og etter vask. Telling av leukocytter etter vask er ikke beskrevet i anbefalingen fra EuroFlow eller i noen av de andre laboratorienes prosedyrer.

3.4. Antistoffmerking

For å sammenlikne måten sykehuslaboratoriene i Trondheim, Bergen, Oslo og Tromsø merker prøver fra pasienter der det er mistanke om KLL med antistoff, og hvordan EuroFlow anbefaler å gjøre det, ble det satt opp en oversikt over fremgangsmåte i tabell 5.

Fremgangsmåte ved antistoffmerking anbefalt av EuroFlow er hentet fra «EuroFlow Standard Operation Procedure (SOP) for Sample preparation and staining», kapittel 4. Fremgangsmåte ved antistoffmerking av prøver ved sykehuslaboratoriene er hentet fra tilsendte prosedyrer som laboratoriene selv har utarbeidet.

Tabell 5: Oversikt over fremgangsmåte i kronologisk rekkefølge ved antistoffmerking av blod og beinmargaspirat fra pasienter der det er mistanke om KLL. Oversikten er en sammenlikning av antistoffmerking som er anbefalt av EuroFlow og antistoffmerkingen ved sykehuslaboratoriene i Trondheim, Bergen, Oslo og Tromsø. Antistoffmix: Blanding av flere antistoffkonjugater i samme løsning.

	Euroflow	Trondheim	Bergen	Oslo	Tromsø
Volum prøvemateriale /antall celler	Volum: 50 µL	Volum: 50-80 µL Antall celler: ≤1,0*10 ⁶ celler per rør	Volum: 50 µL	Volum: 50-150 µL Antall celler: ca.1,0*10 ⁶ celler per rør	Volum: 50 – 200 µL, avhengig av antall celler
Volum antistoff	Volum jfr. panel Bruk av 20µL antistoffmix og enkeltvise antistoffkonjugater	Volum jfr. panel Bruk av 20 µL antistoffmix og enkeltvise antistoffkonjugater	Volum jfr. panel Bruk av 50 µL antistoffmix	Volum jfr. panel Bruk av 50µL antistoffmix eller enkeltvise antistoffkonjugater	Volum jfr. panel Bruk av 7,5 µL antistoffmix og enkeltvise antistoffkonjugater
Totalvolum prøvemateriale + antistoff	100 µL	Max 120 µL	Ikke beskrevet	Ikke beskrevet	Ikke beskrevet
Blanding	Blandes godt	Blandes godt	Blandes godt	Blandes godt	Blandes godt
Inkubasjon	30 min Romtemperatur Lysbeskyttet	30 min Romtemperatur Lysbeskyttet	30 min Romtemperatur Lysbeskyttet	15-30 min Temperatur ikke oppgitt Lysbeskyttet	15 min Romtemperatur Lysbeskyttet
Volum lyseringsbuffer	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	- 100 µL prøve: 2 mL - 50 µL prøve: 1 mL - 200 µL prøve: 3-4 mL
Blanding	Blandes godt	Ikke beskrevet	Blandes godt	Blandes godt	Blandes godt
Inkubasjon	10 min Romtemperatur Lysbeskyttet	10 min Romtemperatur Lysbeskyttet	10 min Romtemperatur Lysbeskyttet	10 min Temperatur ikke oppgitt Lysbeskyttet	10 min Romtemperatur Lysbeskyttet

	EuroFlow	Trondheim	Bergen	Oslo	Tromsø
Blanding	Ikke beskrevet	Ikke beskrevet	Ikke beskrevet	Blandes godt	Ikke beskrevet
Sentrifugering	540 g 5 min	540 g 5 min, m/brems	540 g 5 min	540 g 5 min	1710 rpm (327 g) 3 min
Fjerning av supernatant	Suges av	Dekanter eller sug av	Suges av	Dekanter	Dekanter
Blanding av cellepellet	Blandes godt	Blandes godt	Blandes godt	Ikke beskrevet	Ikke beskrevet
Volum vaskebuffer	2 mL	2-3 mL	2 mL	2 mL	2-3 mL
Blanding	Blandes godt	Blandes godt	Blandes godt	Blandes godt	Blandes godt
Sentrifuger	540 g 5 min	540 g 5 min, m/brems	540 g 5 min	540 g 5 min	1710 rpm (327 g) 3 min
Fjerning av supernatant	Suges av	Dekanter eller sug av	Suges av	Dekanter	Dekanter
Blanding av cellepellet	Blandes godt	Blandes godt	Blandes godt	Blandes godt	Ikke beskrevet
Resuspensjon i bærevæske	Volum: 200 µL	Volum: 200 µL	Volum: 200 µL	Volum: 300 µL	Volum: 700 µL
Analyse og oppbevaring	Analyser på flowcytometer med en gang eller sett kaldt (4°C) i maks 1 time.	Analyser på flowcytometer med en gang eller sett kaldt (4°C) i maks 1 time.	Analyser på flowcytometer med en gang eller sett kaldt (4°C) i maks 1 time.	Analyser på flowcytometer med en gang eller sett kaldt (4°C) i maks 1 time. Lysbeskyttet boks	Analyser på flowcytometer med en gang eller sett kaldt (4°C) i maks 1-2 timer

Anbefalt volum prøvemateriale benyttet ved antistoffmerking av blod og beinmargaspirat, fra EuroFlow følges av laboratoriet i Bergen. Laboratoriene i Trondheim, Oslo og Tromsø velger volum basert på antall leukocytter.

EuroFlow og laboratoriene i Trondheim og Tromsø benytter både antistoffblandinger og enkeltvise antistoffkonjugater. Bergen benytter antistoffblanding mens Oslo benytter enten enkeltvise antistoffkonjugater eller antistoffmix.

Totalvolum for prøvemateriale og antistoff er opplyst hos EuroFlow og laboratoriet i Trondheim. Laboratoriene i Bergen, Oslo og Tromsø har ikke beskrevet dette.

Blanding etter tilsetning av antistoff beskrives i alle prosedyrer.

Anbefalt inkubasjonsforhold etter antistofftilsetning fra EuroFlow følges av laboratoriene i Trondheim og Bergen. Laboratoriene i Oslo og Tromsø har en annen inkubasjonstid.

Laboratoriet i Oslo har ikke beskrevet temperatur ved inkubasjon.

Alle laboratorier, unntatt laboratoriet i Tromsø, følger EuroFlow sin anbefaling for volum lyseringsbuffer. Laboratoriet i Tromsø varierer volum lyseringsbuffer basert på antall leukocytter i prøvematerialet.

Blanding av prøvematerialet etter tilsetning av lyseringsbuffer beskrives i alle prosedyrer, med unntak av prosedyre fra laboratoriet i Trondheim.

Anbefalt inkubasjonsforhold etter tilsetning av lyseringsbuffer fra EuroFlow følges av alle laboratoriene. Laboratoriet i Oslo har ikke beskrevet temperatur ved inkubasjon.

Blanding etter inkubasjon med lyseringsbuffer beskrives kun i prosedyren til laboratoriet i Oslo.

Ved sentrifugering av prøvematerialet etter tilsetning av antistoff og etter tilsetning av lyseringsbuffer følger alle laboratoriene EuroFlow sin anbefaling for sentrifugeringsinnstilling, med unntak av laboratoriet i Tromsø. Laboratoriet i Tromsø sentrifugerer ved en lavere g og i kortere tid. Laboratoriet i Trondheim spesifiserer i tillegg at sentrifuge med brems benyttes.

Fremgangsmåte for fjerning av supernatant anbefalt av EuroFlow, følges av laboratoriet i Bergen. Laboratoriene i Oslo og Tromsø benytter en annen metode. Laboratoriet i Trondheim benytter en av to metoder ved fjerning av supernatant.

Blanding av cellepellet er beskrevet hos alle laboratoriene, med unntak av laboratoriene i Tromsø og Oslo.

Volum vaskebuffer anbefalt av EuroFlow følges av alle laboratoriene. Laboratoriene i Trondheim og Tromsø kan også benytte et litt høyere volum enn det anbefalte.

Ved sentrifugering av prøvematerialet etter tilsetning av vaskebuffer følger alle laboratoriene EuroFlow sin anbefaling for sentrifugeringsinnstilling, med unntak av laboratoriet i Tromsø. Laboratoriet i Tromsø sentrifugerer ved en lavere g og i kortere tid. Laboratoriet i Trondheim spesifiserer i tillegg at sentrifuge med brems benyttes.

Fremgangsmåte for fjerning av supernatant anbefalt av EuroFlow, følges av laboratoriet i Bergen. Laboratoriene i Oslo og Tromsø benytter en annen metode. Laboratoriet i Trondheim benytter en av to metoder ved fjerning av supernatant.

Blanding av cellepellet er beskrevet i prosedyrene til alle laboratoriene, med unntak av laboratoriet i Tromsø.

Anbefalt volum ved resuspensjon av prøvematerialet fra EuroFlow følges av laboratoriene i Trondheim og Bergen. Laboratoriene i Oslo og Tromsø benytter et større volum.

Analysering og oppbevaring er likt ved alle laboratoriene, med noen unntak. Laboratoriet i Oslo spesifiserer lysforhold. Ferdigmerkede prøver kan ved laboratoriet i Tromsø oppbevares litt lenger.

3.5. Markører og fluorokromer

For å sammenlikne bruk av antistoffpaneler, analyserør, fluorokromer og volum antistoffkonjugat ved immunfenotyping av prøver fra pasienter der det er mistanke om KLL, ble informasjonen om dette satt opp i to tabeller, se tabell 6 og tabell 7. Informasjon om analyserørene er hentet fra panelene til EuroFlow og fra tilsendte paneler fra sykehuslaboratoriene. Informasjon om analyserør, fluorokromer og volum av antistoffkonjugat fra EuroFlow og sykehuslaboratoriene i Trondheim, Bergen og Oslo ble satt i tabell 6. Informasjon om analyserør, fluorokromer og volum antistoffkonjugat fra screeningrør som benyttes i Tromsø er også inkludert i tabell 6. Anbefalingen fra EuroFlow ved en klar mistanke om KLL er å benytte LST-røret og deler av, eller hele, B-CLPD-panelet. I denne tabellen har kun B1-røret blitt tatt med som anbefalt fra EuroFlow da det er dette røret som er nødvendig for å kunne stille en KLL-diagnose med utgangspunkt i KLL-skår.

Informasjon om panel, analyserør og fluorokromer fra utvidet analyse ved laboratoriet i Tromsø er satt opp i tabell 7.

Tabell 6: Oversikt over hvilke analyserør, fluorokromer og volum antistoffblanding som anbefales av EuroFlow og som benyttes ved sykehuslaboratoriene i Trondheim, Bergen, Oslo og Tromsø ved immunfenotyping av prøver fra pasienter med mulig KLL. Med utgangspunkt i anbefalinger fra EuroFlow er analyserør og volum som benyttes ved sykehusene og som avviker fra anbefalingene, markert i henholdsvis gul og rød tekst. Markører merket i blå tekst er fra screeningrør som benyttes ved laboratoriet i Tromsø, og som tilsvarer markører som LST- og B1-røret inneholder. *: Fluorokromkonjugatene oppbevares i antistoffblandinger, volumet er totalvolum for begge fluorokromer. †: Alle antistoffkonjugater for hvert rør blandes sammen til en antistoffblanding før tilsetning i analyserør. Forkortelser: Krome Orange (KO), Leukocytassosiert immunoglobulinlignende reseptor 1 (LAIR1), Human leukocyte antigen DR (HLA DR)

	Rør	FITC	µL	PE	µL	PerCP-Cy5.5	µL	PE-Cy7	µL	APC	µL	APC-Cy7/ APC-H7/ AF750	µL	PacB/ HV450	µL	KO/ PacO/ HV500	µL
Euroflow	LST	CD8, Lambda	20*	CD56, Kappa	20*	CD5	15	CD19, TCRγδ	5,0 3,0	CD3	2,5	CD38	3,0	CD20, CD4	1,0 0,5	CD45	5,0
	B1	CD23	2,5	CD10	20	CD79β	10	CD19	5,0	CD200	1,25	CD43	2,5	CD20	1,0	CD45	5,0
Trondheim	LST	CD8, Lambda	2,5 2,5	CD56, kappa	2,5 2,5	CD5	15	CD19, TCRγδ	2,5	CD3	2,5	CD38	2,5	CD20, CD4	2,5 2,5	CD45	2,5
	B1	CD23	2,5	CD10	2,5	CD79β	2,5	CD19	2,5	CD200	5	CD43	2,5	CD20	2,5	CD45	2,5
Bergen (‡)	LST	CD8, lambda	20*	CD56, kappa	20*	CD5	15	CD19, TCRγδ	5,0 3,0	CD3	2,5	CD38	3,0	CD20, CD4	1,0 0,5	CD45	5,0
	B1	CD23	2,5	CD10	20	CD79β	10	CD19	5,0	CD200	1,25	CD43	2,5	CD20	1,0	CD45	5,0
	B2	CD31	10	LAIR1	10	CD11c	10	CD19	5,0	smIgM	10	CD81	5,0	CD20	1,0	CD45	5,0
	1K	Kappa	20*	Lambda	20*	CD5	15	CD23	5,0	CD10	5,0	CD19	5,0	CD20	1,0	CD45	5,0
	1G	CD7	10	CD13	7,0	CD34	10	CD10	5,0	CD117	5,0	CD19	5,0	CD14	4,0	CD45	5,0
Oslo	LST	CD8 Lambda	5 5	CD56, Kappa	10 5	CD5	10	CD19, TCRγδ	2,5 2,5	CD3	2,5	CD38	5	CD20, CD4	1 0,5	CD45	5
	KLL	CD23	10	CD10	20	CD79β	5	CD19	2,5	CD200	5	CD43	5	CD20	1	CD45	5
Tromsø screening	Rør 1	Kappa	7,5*	Lambda	7,5*	CD5	15	CD19	5,0	CD10	2,5	CD34	5,0	CD20	2,5	CD45	3,5
	Rør 2	CD5	10	CD7	5,0	CD8	10	CD2	2,5	CD56	2,5	CD4	5,0	CD3	2,5	CD45	3,5
	Rør 3	CD13	5,0	CD11b	5,0	CD34	10	CD16	1,0	CD33	2,5	CD14	5,0	HLA DR	2,5	CD45	3,5

Tabell 7: Oversikt over antistoffpanel, analyserør og fluorokromer som benyttes ved utvidet analyse ved mistanke om KLL hos en pasient ved sykehuslaboratoriet i Tromsø. Bruk av dette panelet innebærer intracellulær merking, og det brukes derfor en annen fremgangsmåte for merking enn den som er sammenliknet i tabell 2-5, se fremgangsmåte i vedlegg 9. Analyserør fra panelene B-KLL/NHL og B-KLL intracellulært benyttes etter analysering med screeningrør 1-3, se tabell 6. Panelet B-KLL/NHL inkluderer farging av overflatemarkører i blod og beinmargaspirat. Panelet B-KLL intracellulært inkluderer farging av både overflatemarkører og intracellulære markører i blod og beinmargaspirat. Markører merket i rød skrift er fra LST- røret og markører merket blå skrift er fra B1-røret. Markører merket i lilla skrift er markører inkludert i både LST- og B1-røret. Forkortelser: Cytoplasmatisk (cy), overflatemembran (sm),

Panel	Rør	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7/AF750	HV450	HV500
B-KLL /NHL	1	CD56	CD30	CD5	CD19	CD15	CD3	CD20	CD45
	2	CD103	CD123	CD5	CD25	CD11c	CD14	CD20	CD45
	3	CD79 β	CD52	CD5	CD19	CD200	CD38	CD20	CD45
	4	FMC7	CD23	CD5	CD19	CD3	CD43	CD20	CD45
	5	a-IgM	CD22	CD5	CD19	HLA DR	CD34	CD20	CD45
	6	Kappa	Lambda	CD5	CD19	CD10	CD14	CD20	CD45
B-KLL intracellulært	1	IgG1	IgG2a	CD5	CD19	cy-CD3	Sm-CD3	CD20	CD45
	2	cy-kappa	cy-lambda	CD5	CD19	cy-CD22		CD20	CD45
	3	cy-kappa		CD5	CD19			CD20	CD45
	4	cy-lambda		CD5	CD19			CD20	CD45
	5	cy-IgM		CD5	CD19			CD20	CD45

Hvilke rør, og hvilke fluorokromkonjugater som benyttes er noe forskjellig mellom laboratoriene. Laboratoriene i Trondheim, Bergen og Oslo har tatt utgangspunkt i EuroFlow sine anbefalinger ved valg av rør, mens laboratoriet i Tromsø ikke har tatt utgangspunkt i disse.

På laboratoriet i Tromsø benyttes det egne screeningrør for alle pasientprøver som immunfenotypes på laboratoriet. Dersom resultatene fra screeningrøret viser tegn på KLL, benyttes det et nytt og utvidet panel som er spesifikt for denne diagnosen. Dermed er det flere av markørene som er anbefalt fra EuroFlow som ikke er inkludert i screeningpanelet til laboratoriet i Tromsø. I LST-røret fra EuroFlow anbefales det bruk av markørene CD38 og TCR- $\gamma\delta$. Disse er ikke inkludert blant markørene som benyttes til screening eller utvidet analyse ved laboratoriet i Tromsø. Screeningrørene som laboratoriet i Tromsø benytter, inneholder to av fem markører fra KLL-skåren (tabell 1), markørene kappa/lambda og CD5. Rør 3 og 4 fra utvidet analysering inneholder de tre siste: CD23, CD79 β og CD200.

Laboratoriet i Bergen benytter fem rør for pasientprøver der det er mistanke om KLL. I tillegg til LST-røret og B1-røret, har de valgt å inkludere et tredje rør fra B-CLPD-panelet som er utviklet av EuroFlow. I tillegg til dette har laboratoriet i Bergen inkludert to «in-house»-rør.

Laboratoriet i Trondheim avviker fra anbefalingen gitt av EuroFlow når det kommer til volum antistoffkonjugat. Volum antistoffkonjugat avviker også fra anbefalingen fra EuroFlow ved laboratoriet i Oslo og Tromsø.

4. Diskusjon

Det finnes ingen absolutt måte å utrede pasienter for KLL, og standarden som EuroFlow har utformet for flowcytometrisk immunfenotyping er ikke en standard som sykehuslaboratoriene er pålagt å følge. I denne studien fant vi ut at de fire sykehuslaboratoriene i Trondheim, Bergen, Oslo og Tromsø i ulik grad har tatt utgangspunkt i EuroFlow sine anbefalinger ved utforming av prosedyrer og paneler. I de seks tabellene, tabell 2-7, observeres det både likheter og forskjeller mellom prosedyrer og paneler ved de fire sykehusene og anbefalingene fra EuroFlow. Videre i diskusjonen er det kun forskjellene som blir diskutert, og det blir i hovedsak lagt vekt på forskjellene der laboratoriet i Trondheim avviker fra anbefalingen gitt av EuroFlow eller prosedyrene til de andre sykehuslaboratoriene. Det antas at ulikhetene ikke påvirker sensitivitet eller spesifisitet når diagnosen KLL stilles. For å verifisere dette, kreves videre studier og utprøvinger av ulikhetene som ble funnet.

Panel og analyserør

Alle sykehuslaboratoriene har samme mål ved immunfenotyping. Det er å analysere et tilstrekkelig antall markører for å kunne gi ut en KLL-skår. Sykehuslaboratoriernes strategi ved valg av analyserør og antistoffpanel varierte noe. Det ble også observert forskjeller i mengde antistoffkonjugat som ble brukt.

I situasjoner der pasienten har kliniske tegn på KLL anbefaler EuroFlow at både LST-røret og hele eller deler av B-CLPD-panelet benyttes. EuroFlow spesifiserer ikke hvilke(t) av rørene i B-CLPD-panelet som bør inkluderes. Som følge av dette observeres det forskjeller i valg av analyserør fra B-CLPD-panelet hos laboratoriene som følger anbefalingene fra EuroFlow. Se vedlegg 2, side 2 for B-CLPD-panel.

Laboratoriene som følger anbefalte analyserør og panel som er utarbeidet av EuroFlow ved mistanke om KLL hos en pasient, er laboratoriene i Trondheim, Oslo og Bergen.

Laboratoriene i Trondheim og Oslo benytter seg av LST-røret og B1-røret. Dette er de to første rørene i B-CLPD-panelet, og disse inneholder alle markører som er nødvendige for å kunne gi ut en KLL-skår. Ved laboratoriet i Bergen blir det i tillegg til disse to rørene brukt tre andre rør, ett fra B-CLPD-panelet, og to in-house panel. De tre siste rørene som benyttes i Bergen er ikke nødvendige for å kunne gi ut en KLL-skår.

Laboratoriet i Tromsø ser ikke ut til å ha tatt utgangspunkt i anbefalingene fra EuroFlow ved valg av paneler. Alle prøver, også prøver fra pasienter med kliniske tegn på KLL eller annen

lymfoproliferativ sykdom, blir analysert ved bruk av samme screeningpanel. Screeningpanelet består av tre rør som har markører som er karakteristiske for cellelinjer som kan være av interesse. Dersom resultatene etter screening viser tegn på en malign tilstand, vil det bli gått videre med et nytt panel som er spesifikt for den tilstanden som det mistenkes at pasienten har. Ved mistanke om KLL blir det tatt utgangspunkt i KLL-skår og brukt rør som inneholder markører som er inkludert i denne. Fordelen med denne strategien er at den starter bredt, eliminerer bort andre maligne hematologiske tilstander og retter seg deretter mer inn mot en spesifikk tilstand. Ulemper ved denne strategien er at det tar lenger tid å stille en diagnose, i tillegg til høyere kostnader ettersom det benyttes flere antistoffkonjugater.

Laboratoriet i Bergen setter opp flere analyserør enn de andre laboratoriene som følger anbefalinger gitt av EuroFlow. Dette kan gi en tidligere diagnose av andre lymfoproliferative tilstander, fordi flere markører blir testet for på et tidligere stadium enn ved laboratoriene i Trondheim og Oslo. Ulempen med denne strategien er at antistoffkonjugater er veldig kostbare. KLL er den mest vanlige lymfoproliferative sykdommen og analysering av mange markører, som går utenfor de som dekker KLL-skåren, kan økonomisk sett være uhensiktsmessig å analysere for alle pasienter.

Laboratoriene i Trondheim og Oslo har en panelstrategi der det settes opp få rør. B1-røret er mer spesifikt for KLL, mens LST-røret screener for andre lymfoproliferative sykdommer, slik at KLL kan skiller fra disse sykdommene. LST-røret benyttes også som et screeningrør i et eget panel, se vedlegg 2, side 1, og inneholder derfor markører som er rettet mot B- og T-lymfocytter og NK-celler. Strategien med bruk av ett screeningrør og ett rør som er spesifikt for B-lymfocytter, kan innebære raskere diagnose av KLL-pasienter, samtidig som det ikke brukes mange unødvendige og kostbare antistoffkonjugater. En ulempe ved en slik strategi er at det vil ta lenger tid å stille en diagnose dersom en pasient har en annen hematologisk tilstand enn KLL, da rør som er spesifikke for hematologiske tilstander i andre cellelinjer ikke er inkludert. Dette vil også føre med seg flere runder med utredning av disse pasientene, som vil kreve kostbar arbeidstid fra både bioingeniører og leger.

Om det er mest praktisk, tidsbesparende og økonomisk å 1: sette opp få rør dersom en type diagnose mistenkes, slik det blir gjort ved laboratoriene i Trondheim og Oslo, 2: sette opp flere rør samtidig slik det blir gjort ved laboratoriet i Bergen eller 3: å starte bredt slik det blir gjort ved laboratoriet i Tromsø med tanke på at andre hematologiske sykdommer kan oppdages tidligere, kan undersøkes nærmere.

Ved flowcytometrisk immunfenotyping av prøver fra pasienter der det er mistanke om KLL benyttes det antistoff rettet mot omtrent de samme markørene ved laboratoriene både i Trondheim, Oslo og Bergen. Dette gjør det lettere å sammenlikne analysesvar i flowcytogram mellom disse sykehusene. I Tromsø benyttes det en annen strategi. Når panel og analyserør som benyttes ikke er de samme, vil sammenlikning av flowcytogram på tvers av sykehuslaboratorier bli vanskeligere.

Laboratoriene i Trondheim, Oslo og Tromsø avviker fra anbefalingen som er gitt fra Euroflow når det kommer til volum som benyttes av hvert antistoffkonjugat. I denne oppgaven er ikke kloner og produsenter av fluorokromkonjugat inkludert i sammenlikningen. Det er antatt og tatt utgangspunkt i at laboratoriene som følger EuroFlow, også følger EuroFlow sine anbefalinger ved valg av klon og produsent. Laboratoriet i Tromsø har egenproduserte paneler og rør for screening og utvidede analyser. Det er derfor ikke relevant å se på volumforskjellen fra EuroFlow som observeres her.

Ved tilsetning av antistoff til prøvematerialet vil konsentrasjonen til antistoffet fortynnes. Volumet av antistoff som tilsettes må derfor justeres basert på hvor stort volumet til prøvematerialet er. Laboratoriene i Trondheim og Oslo har tatt utgangspunkt i panel fra EuroFlow, men benytter andre prøvevolum. Det tilsettes prøvevolum tilsvarende $1,0 \cdot 10^6$ celler og volum justeres opp til 50-80 μL i Trondheim og 50-150 μL i Oslo ved tilsetning av bærevæske (BD FACSDiva). Dette gjøres for å holde volumet mest mulig konstant. Dersom det tilsettes samme volum antistoff til et volum på 50 μL og 150 μL vil antistoffet fortynnes tre ganger mer for volumet på 150 μL . Ved laboratoriet i Trondheim kompenseres dette for ved at mengde antistoff ganges opp slik at antistoffkonsentrasjonen blir mest mulig lik ved forskjellige prøvevolum. Ved laboratoriet i Trondheim har antistoff som har vist seg å ikke ha optimal konsentrasjon, blitt titrert lokalt på laboratoriet. Volum antistoff som tilsettes er basert på disse titreringene, og avviker derfor fra volum anbefalt av EuroFlow ved mange av antistoffkonjugatene som benyttes. (pers. kom. Spesialbioingeniør G.V. Leirvik) Anbefalinger om volum kan bli gitt fra både EuroFlow, fra produsentene som lager antistoffkonjugatene og fra egne antistofftitreringer. Hvilket volum som gir det mest optimale resultatet kan variere mellom laboratorier og instrumenter.

Vask av prøvemateriale før farging

Antall ganger prøvematerialet blir vasket er ulikt ved alle laboratoriene. Vasking av prøvematerialet blir gjort for å fjerne ubundet kappa og lambda, da store mengder av disse i

prøven kan binde opp antistoffkonjugatene som er rettet mot kappa og lambda på cellenes overflate. Dette kan resultere i at metningen av antistoff blir for lav, og det vil kunne bli gitt ut falskt negativt svar. Å vaske prøver der kappa og lambda ikke skal påvises krever mer tid ved prøvepreparering før analyse på flowcytometer. Fordelen med å vaske disse prøvene er i situasjoner der det er nødvendig med oppfølgingsrør for at det skal kunne stilles en diagnose. Allerede ferdigvasket prøvemateriale vil være klart for merking, og sørge for at prosessen går raskere i de situasjonene det er behov for oppfølgingsrør.

Laboratoriet i Trondheim avviker fra anbefalingen til EuroFlow og fra de andre laboratoriene når det kommer til volum prøvemateriale og hvilke rør som benyttes. Fordi at alt prøvemateriale vaskes ved laboratoriet i Trondheim, benyttes det 50 mL rør ved vask, i stedet for at det blir vasket direkte i analyserøret slik det gjøres ved flere av de andre sykehuslaboratoriene. Fordelen med dette er at det kun er ett rør som må håndteres og avpipetteres ved hvert av stegene i vaskeprosessen. En ulempe med vasking i 50 mL rør er at det må benyttes sentrifuge uten brems for å sikre at prøvematerialet ikke løsner fra bunnen. Denne sentrifugen bruker lang tid på å stoppe og dette er derfor et særlig tidkrevende steg i vaskeprosessen.

Om det er mest lønnsomt å vaske alt prøvematerialet på en gang, og dermed slippe å håndtere mange rør samtidig og slippe å vaske prøvematerialet fra samme pasient senere dersom det trengs oppfølgingsrør, er vanskelig å konkludere med. Innhenting av informasjon som gjelder frekvensen for bruk av oppfølgingsrør er nødvendig for å kunne konkludere med om det er nødvendig og gunstig å vaske prøver som ikke skal undersøkes for kappa eller lambda.

Ved laboratoriene i Trondheim, Oslo og Tromsø bestemmes prøvevolum som skal merkes med antistoff ut fra antall leukocytter som tilsettes i hvert rør. I Trondheim telles leukocytene både før og etter vasking. Dette er ikke beskrevet i de andre laboratorienes prosedyrer. Etter vasking har volum i prøverøret endret seg som følge av at cellene ikke resuspendes, og forholdsmessig celledetall er ikke lenger det samme som før vask. Som følge av dette må leukocytene telles på nytt. Telling både før og etter vaskeprosessen vil også fungere som en kontroll for å sikre at ikke for mange leukocytter er mistet i løpet av vaskeprosessen. Dette er ikke nødvendig ved resuspensjon til opprinnelig volum da det forholdsmessige antallet leukocytter vil være det samme som før vask. Altså kan laboratoriet i Trondheim spare både tid og reagenser ved å enten resuspendere vasket prøvemateriale, eller ved å vaske kun det ønskede antallet leukocytter. Uten utprøvinger kan det ikke konkluderes med om det er best å telle cellene etter vask eller å resuspendere dem tilbake til opprinnelig volum.

Reagenser

Hverken vaskeløsningene som benyttes ved sykehuslaboratoriene i Trondheim og Oslo eller BD FACSSFlow, som benyttes ved laboratoriet i Tromsø, inneholder natriumazid (NaN_3). Her avviker altså disse laboratoriene fra anbefalingen som blir gitt av Euroflow.

NaN_3 blir tilsatt til vaskebufferen for å hindre bakterievekst. Samtidig er stoffet både giftig og miljøfarlig. (27) Stoffet benyttes særlig ved produksjon av store mengder vaskebuffer som skal oppbevares i et miljø der bakterievekst er mulig. Ulempen med å ikke følge anbefalingen som er gitt av EuroFlow er faren for bakterievekst i vaskebufferen. Fordelen er at personalet som er ansvarlig for produksjonen av vaskebufferen slipper å håndtere det giftige stoffet. Av helse- miljø- og sikkerhetshensyn (HMS-hensyn) ble det derfor bestemt at NaN_3 ikke brukes ved sykehuslaboratoriet i Trondheim.

Det har blitt kompensert for å ikke inkludere NaN_3 i vaskebufferen ved laboratoriet i Trondheim ved hyppig utskifting av reagenset, ved at den blir oppbevart kaldt og ved desinfisering av beholdere og utstyr etter bruk. I tillegg til dette har laboratoriefasilitetene der vaskebufferen benyttes stabile temperaturer og høy standard når det kommer til vask og hygiene på laboratoriet. (pers. kom. Spesialbioingeniør G. V. Leirvik) Disse tiltakene er alle med på å sikre at sannsynligheten for bakterievekst er liten. I situasjoner der vaskebufferen derimot blir laget i store mengder, skal oppbevares lenger enn det blir gjort i Trondheim, og med færre tiltak knyttet til å hindre bakterievekst, vil bruk av NaN_3 i vaskebuffer være viktigere.

Dette er altså et punkt der flere av laboratoriene avviker fra anbefalingen som blir gitt av EuroFlow, men om NaN_3 likevel bør inkluderes i vaskebufferen som brukes ved laboratoriet i Trondheim og i Oslo kan ikke konkluderes med i denne studien. Det kan heller ikke konkluderes med om BD FACSSFlow, vaskebufferen som benyttes ved laboratoriet i Tromsø, kan benyttes på lik linje som anbefalt vaskebuffer fra EuroFlow. Dette foreslås dermed som en mulig videre studie.

Filtrering av beinmargaspirat

Ved laboratoriene i Trondheim, Bergen og Tromsø er det oppgitt i prosedyrene at maskestørrelse ved bruk av filter er henholdsvis 100, 30 og 30/50 μm . Filter benyttes i hovedsak for å fjerne komponenter som fnokker og koagler i beinmargaspirat da disse kan være så store at flowcytometeret kan tettes. Bruk av filter kan derfor være tidsbesparende for

laboratoriene med tanke på behovet for vedlikehold. I tillegg til fjerning av større komponenter fra beinmargsaspirat kan filtreringen sørge for at cellene i prøven ikke klumper seg for mye sammen.

En risiko ved bruk av filter er at noen av leukocytterne i prøven blir liggende i filteret og ikke i røret der de skal merkes og analyseres. Normal leukocytstørrelse er 9-18 μ m. (29) Dette betyr at alle filtrene som benyttes ved de forskjellige laboratoriene er store nok til å slippe leukocytterne gjennom. Et 30 μ m filter vil la alt av leukocytter passere, og på samme tid fjerne flere av de store komponentene enn det blir fjernet ved bruk av 100 μ m filter.

100 μ m filteret har ønsket funksjon, fordi de største komponentene blir filtrert bort samtidig som leukocytterne ikke blir det. Maskestørrelsen er likevel større enn 30 μ m og 50 μ m, og dermed kan det være flere store komponenter som blir med i prøverøret, enn ved bruk av en mindre maskestørrelse. Valg av maskestørrelse for filter må undersøkes nærmere for at det skal være mulig å si noe om konsekvensene dette kan ha for mengde vedlikehold som må utføres på flowcytometeret.

Blanding av prøvematerialet

Å blande opp prøvematerialet blir anbefalt av Euroflow ved tilførsel av reagenser og etter sentrifugering. Etter tilførsel av lyseringsbuffer anbefaler EuroFlow at prøvematerialet og lyseringsbufferen blandes. Denne anbefalingen følger alle sykehuslaboratoriene, med unntak av laboratoriet i Trondheim. Blandingen skal sikre at alle erytrocytter kommer i kontakt med lyseringsbufferen slik at de går i oppløsning. At det ikke står opplyst i prosedyren til Trondheim om blanding etter tilsats av lyseringsbuffer kan derfor ha som konsekvens at noen erytrocytter ikke lyseres. Ved laboratoriet i Oslo brukes et ekstra blandingssteg etter tilførsel av lyseringsbuffer og inkubasjon. Dette spesifiseres i prosedyren for å sikre at alle erytrocytter blir lysert. Blandingsstegene har som formål å få prøvematerialet i kontakt med vaskeløsningen, alle erytrocytter i kontakt med lyseringsbufferen og alle leukocytter i kontakt med antistoffkonjugatene. Så lenge disse punktene er oppfylt er ikke avvikene av stor betydning.

I denne oppgaven har det blitt tatt utgangspunkt i prosedyrene som benyttes ved sykehuslaboratoriene, og ikke i det som blir gjort i praksis. Av den grunn er det mulig at flere av laboratoriene i praksis blander prøven ved alle aktuelle steg, men at dette ikke står i prosedyren.

Inkubering

Inkubering av prøvematerialet skjer to ganger i løpet av merkingsprosessen. Dette er både etter tilførsel av antistoff og etter tilførsel av lyseringsbuffer. EuroFlow anbefaler å inkubere i 30 minutter, lysbeskyttet og ved romtemperatur etter tilførsel av antistoff. Dette følger laboratoriene i Trondheim og Bergen. Laboratoriene i Oslo og Tromsø avviker når det kommer til lengde på inkubasjonen. I prosedyren som laboratoriet i Oslo benytter er det ikke oppgitt hvilken temperatur inkubasjonen skjer ved, men det er sannsynlig at også denne inkubasjonen skjer ved romtemperatur. Dette er de eneste forskjellene som er observert når det kommer til inkubering. Inkubasjonen skal sikre at antistoffkonjugater bindes til leukocytter med tilhørende antigener. Forskjellen i inkubasjonstid kan ha noe å si for om antistoffene rekker å binde seg til leukocytene. Dersom antistoffene ikke får nok tid til å binde seg til markørene vil de i senere trinn bli vasket bort. Om kortere inkubasjonstid har en reell konsekvens for resultatet kan ikke konkluderes med i denne studien.

Fjerning av supernatant

Etter hver sentrifugering fjernes supernatant ved bruk av vakuumsystem, Pasteur pipette eller dekantering. Anbefalingen som blir gitt fra Euroflow om bruk av vakuumsystem for fjerning av supernatant følges av alle laboratoriene i vaskeprosessen. Ved merking av leukocytene avviker de derimot noe fra hverandre og fra anbefalingen gitt av Euroflow. EuroFlow anbefaler at fjerningen av supernatant skal skje ved bruk av vakuumsystem også her, mens flere av sykehuslaboratoriene velger å dekantere. Ved dekantering etter at erytrocyttene har blitt lysert er det usannsynlig at noen av leukocytene skal forsvinne, da cellepelletten vil sitte godt fast i bunnen av røret. Dekantering kan være en mer effektiv måte å fjerne supernatant på, som samtidig sørger for et lavere forbruk av pipetter. Det benyttes ulike teknikker for fjerning av supernatant, men valg av teknikk vil ha liten innvirkning på sensitiviteten og spesifisiteten til resultatet. Det kan derimot påvirke økonomi og tidsbruk.

Forslag til videre studier

I denne oppgaven er det belyst forskjeller mellom EuroFlow og sykehuslaboratoriene i Trondheim, Bergen, Oslo og Tromsø. For å kunne si noe om hvilken betydning disse forskjellene har, vil videre studier på følgende punkter være aktuelle:

- Om det er mest praktisk, tidsbesparende og økonomisk lønnsomt å velge en strategi for panelbruk som benytter paneler som dekker mange lymfoproliferative tilstander, eller en strategi med spesifikke panel som fokuserer på en eller få tilstander.
- På hvilke måter vaskeprosessen ved laboratoriet i Trondheim kan endres for å spare ressurser og tid, med tanke på hvor ofte det er nødvendig med oppfølgingsrør etter analyse med bruk av LST- og B1-røret for å kunne stille en diagnose.
- Behovet for bruk av NaN_3 i vaskebuffer.
- Bruk av filter og valg av maskestørrelse for filter.

5. Konklusjon

Hensikten med oppgaven var å finne ut hvordan pasientprøver ved mistanke om KLL håndteres, og hvilke forskjeller det er mellom prosedyrer og paneler ved forskjellige sykehuslaboratorier i Norge og standarder utarbeidet av EuroFlow.

EuroFlows anbefalinger for prøvepreparering blir i hovedsak fulgt av alle laboratoriene som er inkludert i denne sammenlikningsstudien. Blant forskjellene som ble observert var ulike strategier for panelbruk, ulikt volum prøvemateriale som ble vasket, og ulik komposisjon av vaskebuffer. Når det kommer til strategi for panelbruk følger laboratoriene i Trondheim, Bergen og Oslo anbefalinger som er gitt av EuroFlow, mens laboratoriet i Tromsø benytter seg av et større screeningpanel for så å rette seg inn mot en spesifikk diagnose. Ved laboratoriet i Trondheim vaskes alt prøvemateriale tre ganger, hvilket er avvikende fra anbefalingen gitt av EuroFlow og fra de andre laboratoriene. I tillegg benytter laboratoriene i Trondheim og Oslo en vaskebuffer uten NaN_3 , i motsetning til vaskebufferen som er anbefalt av EuroFlow.

Det antas at forskjellene som finnes mellom prosedyrene fra sykehuslaboratoriene og anbefalingene fra EuroFlow ikke har konsekvenser for den diagnostiske sensitiviteten eller spesifisiteten, men at det kan ha konsekvenser for økonomi og tidsbruk.

6. Referanser

1. Helsedirektoratet. 7.3 Behandling - Nasjonalt handlingsprogram med retningslinjer for diagnostikk, behandling og oppfølging av maligne blodsykdommer, 2020 [Internett]. 2020 [sitert 25. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/maligne-blodsykdommer/kronisk-lymfatisk-leukemi-kl/behandling>
2. Kaushansky K, Prchal JT, Press OW, Lichtman MA, Levi M, Burns LJ, mfl. Williams hematology. Ninth edition. New York: McGraw-Hill; 2016. (Hematology).
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Thiele J, mfl. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. (World Health Organization classification of tumours).
4. Turgeon ML. Clinical hematology : theory and procedures. Sixth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2018.
5. Vikse J. immunglobuliner. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2021 [sitert 5. mai 2021]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/immunglobuliner>
6. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood*. 2011;117(6):1781–91.
7. Kaur P. Chronic Lymphocytic Leukemia: Pathobiology, B Cell Receptors, Novel Mutations, Clonal Evolution. Cham: Cham: Springer International Publishing AG; 2018. (Molecular and Translational Medicine).
8. Rodríguez D, Bretones G, Arango JR, Valdespino V, Campo E, Quesada V, mfl. Molecular pathogenesis of CLL and its evolution. *Int J Hematol*. 2015;101(3):219–28.
9. Ghia P, Caligaris-Cappio F. The Origin of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Semin Oncol*. 2006;33(2):150–6.
10. Linet MS, Schubauer-Berigan MK, Weisenburger DD, Richardson DB, Landgren O, Blair A, mfl. Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. *British journal of haematology*. 2012 2007;139(5):672–86.

11. Caporaso N. Chips, candidate genes, and CLL. *Blood*. 2006;108(2):415–6.
12. Oscier D, Fegan C, Hillmen P, Illidge T, Johnson S, Maguire P, mfl. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2004;125(3):294–317.
13. Oscier D, Fegan C, Hillmen P, Illidge T, Johnson S, Maguire P, mfl. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2004;125(3):294–317.
14. Helsedirektoratet (2016). Pakkeforløp for kronisk lymftisk leukemi [Internett]. Helsedirektoratet. [sitert 23. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.helsedirektoratet.no/pakkeforlop/kronisk-lymfatisk-leukemi>
15. Hallek M, Cheson BD, Kipps TJ, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, mfl. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia : a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446–56.
16. Rawstron AC, Kreuzer K, Soosapilla A, Spacek M, Stehlikova O, Gambell P, mfl. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry B Clin Cytom*. januar 2018;94(1):121–8.
17. Lea T. Immunologi og immunologiske teknikker. 3. utgave. Fagbokforlaget; 2006.
18. Fenstad MH, Rø AD. Flowcytometri i klinisk praksis. *Bioingeniøren* [Internett]. [sitert 23. mars 2021]; Tilgjengelig på: <http://www.bioingenioren.no/fag/fag-originalartikkel/flowcytometri-i-klinisk-praksis/>
19. Fossum S. fluorescens. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2019 [sitert 14. april 2021]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/fluorescens>
20. Keohane EM, Otto CN, Walenga JM. *Rodak's Hematology: Clinical Principles and applications*. Sixth. Elsevier inc; 2020.
21. BD_FACS_Canto_II_Users_Guide.pdf [Internett]. [sitert 22. mars 2021]. Tilgjengelig på: https://pedsresearch.org/_files/BD_FACS_Canto_II_Users_Guide.pdf
22. Spectrum Viewer | BD Biosciences-US [Internett]. [sitert 5. mai 2021]. Tilgjengelig

på: <https://www.bdbiosciences.com/en-us/applications/research-applications/multicolor-flow-cytometry/product-selection-tools/spectrum-viewer>

23. BD Biosciences. BD FACSCanto II brukermanual.
24. Hulspas R. Titration of Fluorochrome-Conjugated Antibodies for Labeling Cell Surface Markers on Live Cells. *Curr Protoc Cytom.* 2010;54(1):6.29.1-6.29.9.
25. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, mfl. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* september 2012;26(9):1908–75.
26. About Euroflow [Internett]. [sitert 10. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.euroflow.org/about/>
27. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, mfl. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia.* september 2012;26(9):1986–2010.
28. Protocols [Internett]. [sitert 11. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.euroflow.org/protocols>
29. Tigner A, Ibrahim SA, Murray I. Histology, White Blood Cell. I: StatPearls [Internett]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [sitert 7. mai 2021]. Tilgjengelig på: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563148/>

7. Vedlegg

Vedlegg 1: SOP for forbehandling og merking fra Euroflow



EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP)

for

Sample preparation and staining

Version 1.5 (19 August 2019)

Updated in Version 1.5

- Corrections of typing errors (page 3, 4, 5, 7).

For complementary information or questions, please go to www.euroflow.org or contact Juan Flores-Montero at jflores@usal.es.

EuroFlow SOP for Sample preparation and staining

Content

1. General remarks	3
2. Common initial procedure when the EuroFlow antibody panel includes surface membrane (Sm) immunoglobulins (Ig) staining	3
3. Staining of backbone markers	4
4. Staining of surface markers only	5
5. Combined staining of intracellular and surface membrane markers	6
6. Nuclear (Nu) TdT staining (tube 4 AML/MDS EuroFlow panel)	7
7. Overview of protocol sections for the various EuroFlow antibody panels and corresponding tubes	8

1. General remarks, working definitions and materials references

- Please comply with all recommendations, even small deviations will impact the results.
- FACS Lysing Solution (10X concentrate): BD B; Cat No: 349202
- Sodium Azide (NaN_3): Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), Cat No: 71290-100g
- Bovine Serum Albumin (BSA): Sigma-Aldrich, Cat No: A7030-500g
- EDTA: Merck (Darmstadt, Germany), Cat No: 108418
- Fix&Perm™, Nordic-MUBio, Susteren, The Netherlands, Cat No: GAS-002-1
- Washing buffer: Filtered PBS (1X) Na^+/K^+ + 0.09% of NaN_3 + 0.2% BSA and 2mM EDTA solution
- Acquisition buffer (NaN_3 free): Filtered PBS + 0.2% BSA + 2mM EDTA or BD FACS flow solution
- Please note that pH of the washing buffer is recommended to be set and maintained at 7.4
- Please use >98% pure BSA
- Composition of filtered PBS (1X) Na^+/K^+ : KCl 2.68 mM + KH_2PO_4 1.47 mM + NaCl 137 mM + Na_2HPO_4 7.98 mM

2. Common initial procedure when the EuroFlow antibody panel includes surface membrane (Sm) immunoglobulin (Ig) staining

If the EuroFlow antibody panel to be applied includes Smlg staining, follow these initial steps; otherwise go directly to the backbone, surface, or intracellular staining protocols (sections 3, 4, 5, respectively):

2.1. Pipette 300 μL of sample into a 10 mL Falcon tube (see Note 1).

Note 1: For small samples (i.e. CSF, vitreous aspirates) spin down the total volume (5 min at 540 g), discard the supernatant (see point 2.7) and resuspend in 300 μL of washing buffer.

- 2.2. Add 6 mL of washing buffer
- 2.3. Mix well, preferably by gently vortexing
- 2.4. Fill the tube up to 10 mL (by adding 4 mL of washing buffer)
- 2.5. Mix well, preferably by gently vortexing
- 2.6. Centrifuge for 5 min at 540 g
- 2.7. Discard the supernatant using a Pasteur pipette or vacuum system without disturbing the cell pellet
- 2.8. Mix well, preferably by gently vortexing
- 2.9. Repeat point 2.2 to 2.8 two times (in total 3 washing steps)
- 2.10 Resuspend the cell pellet in 300 μ L of washing buffer
- 2.11 Continue with conventional EuroFlow SOPs for staining of cell surface or cell surface plus intracellular markers as described below in Sections 3, 4 and 5, respectively

3. Staining of backbone markers

- 3.1. Calculate the total volume of surface membrane backbone antibodies based on the number of tubes in the panel (see Note 2)

*Note 2: Intracellular backbone markers **must** not be added at this time*

- 3.2. Pipette these antibodies in one tube (backbone tube)
- 3.3. Calculate the total volume of sample to be stained, also based on the number of tubes in the panel and a volume of 50 μ L per tube
- 3.4. Pipette this sample volume into the backbone tube
- 3.5. Mix well, preferably by gently vortexing
- 3.6. Pipette equal amounts of the sample-backbone mix into the various tubes included in the applied EuroFlow panel (see Note 3).

Note 3: Both the volume pipetted into each tube and the overall number of tubes depend on the specific EuroFlow panel that is applied

- 3.7. Continue with the steps described below in Section 4 or 5

4. Staining of surface markers only

Note 4: PCD tube 2 is processed identically to PCD tube 1 as described in section 5 if CD138-PacO is used

- 4.1. Add the appropriate volume of antibodies directed against cell surface markers (except for the backbone markers), as recommended for each specific EuroFlow panel
- 4.2. If necessary, use washing buffer to reach a final volume of 100 μ L per tube (see information on the EuroFlow panels)
- 4.3. Mix well, preferably by gently vortexing
- 4.4. Incubate for 30 min at room temperature (RT) protected from light
- 4.5. Add 2 mL of 1X FACS Lysing Solution (10X FACS Lysing Solution diluted 1/10 vol/vol in distilled water-dH₂O- following manufacturers recommendations)
- 4.6. Mix well, preferably by gently vortexing
- 4.7. Incubate for 10 min at RT protected from light
- 4.8. Centrifuge for 5 min at 540 g
- 4.9. Discard the supernatant using a Pasteur pipette or vacuum system without disturbing the cell pellet, leaving approximately 50 μ L residual volume in each tube
- 4.10. Mix well, preferably by gently vortexing
- 4.11. Add 2 mL of washing buffer to the cell pellet
- 4.12. Mix well, preferably by gently vortexing
- 4.13. Centrifuge for 5 min at 540 g
- 4.14. Discard the supernatant using a Pasteur pipette or vacuum system without disturbing the cell pellet, leaving approximately 50 μ L residual volume in each tube
- 4.15. Mix well, preferably by gently vortexing
- 4.16. Resuspend the cell pellet in 200 μ L of acquisition buffer
- 4.17. Acquire the cells preferably immediately after staining or store at 4°C maximally for 1 hour until measured in the flow cytometer

5. Combined staining of Intracellular and Surface membrane markers

Note 5: Tube 4 of the AML/MDS panel should be stained as described in Section 6

- 5.1. Add the appropriate volumes of antibodies for cell surface markers, as recommended for each specific EuroFlow panel
- 5.2. If necessary, use washing buffer to reach a volume of 100 μ L per tube (see information on the EuroFlow panels)
- 5.3. Mix well, preferably by gently vortexing
- 5.4. Incubate for 30 min at RT protected from light
- 5.5. Add 2 mL of washing buffer to the cell pellet
- 5.6. Mix well, preferably by gently vortexing
- 5.7. Centrifuge for 5 min at 540 g
- 5.8. Discard the supernatant using a Pasteur pipette or vacuum system without disturbing the cell pellet, leaving approximately 50 μ L residual volume in each tube
- 5.9. Resuspend the cell pellet by mixing gently, preferably by vortexing
- 5.10. Add 100 μ L of Reagent A (fixative; Fix&Perm™) and mix well by vortexing for 1-2 seconds
- 5.11. Incubate for 15 min at RT protected from light
- 5.12. Add 2 mL of washing buffer to the cell pellet
- 5.13. Mix well, preferably by gently vortexing
- 5.14. Centrifuge for 5 min at 540 g
- 5.15. Discard the supernatant using a Pasteur pipette or vacuum system without disturbing the cell pellet, leaving approximately 50 μ L residual volume in each tube
- 5.16. Mix vigorously by vortexing to fully resuspend the cell pellet
- 5.17. Add 100 μ L of Reagent B (permeabilizing solution; Fix&Perm™)
- 5.18. Mix well, preferably by gently vortexing
- 5.19. Add the appropriate volume of the intracellular antibodies (see EuroFlow panels)
- 5.20. Mix well, preferably by gently vortexing
- 5.21. Incubate for 15 min at RT protected from light
- 5.22. Add 2 mL of washing buffer to the cell pellet
- 5.23. Mix well, preferably by gently vortexing

- 5.24. Centrifuge for 5 min at 540 g
- 5.25. Discard the supernatant using a Pasteur pipette or vacuum system without disturbing the cell pellet, leaving approximately 50 μ L residual volume in each tube
- 5.26. Mix well, preferably by gently vortexing
- 5.27. Resuspend the cell pellet in 200 μ L of acquisition buffer
- 5.28. Acquire the cells preferably immediately after staining or store at 4°C maximally for 1 hour until measured in the flow cytometer

6. Nuclear (Nu)TdT staining (Tube 4, AML/MDS EuroFlow panel)

- 6.1. Continued from Section 4 step 15
- 6.2. Add the appropriate amount of the TdT antibody to the cell pellet
- 6.3. Mix well, preferably by gently vortexing
- 6.4. Incubate for 15 min at RT protected from light
- 6.5. Add 2 mL of washing buffer to the cell pellet
- 6.6. Mix well, preferably by gently vortexing
- 6.7. Centrifuge for 5 min at 540 g
- 6.8. Discard the supernatant using a Pasteur pipette or vacuum system without disturbing the cell pellet, leaving approximately 50 μ L residual volume in each tube
- 6.9. Mix well, preferably by gently vortexing
- 6.10. Resuspend the cell pellet in 200 μ L acquisition buffer
- 6.11. Mix well, preferably by gently vortexing
- 6.12. Acquire the cells preferably immediately after staining or store at 4°C maximally for 1 hour until measured in the flow cytometer

7. Overview of SOP Sections for the various EuroFlow antibody panels and corresponding tubes.

Antibody Panel	Tube(s)	EuroFlow SOP procedure				
		2	3	4	5	6
ALOT	1				X	
BCP-ALL	1,4	X	X	X		
	2,3	X	X		X	
T-ALL	1-4		X		X	
AML/MDS	1-3, 5-7		X	X		
	4		X	X		X
LST	1	X		X		
SST	1	X		X		
PCD	1-2		X		X	
B-CLPD	1-4	X	X	X		
T-CLPD	1,2,4,6		X	X		
	3,5		X		X	
NK-CLPD	1,2		X	X		
	3		X		X	

ALOT, Acute leukemia orientation tube; BCP-ALL, B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia; T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukemia; AML/MDS, Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome; LST, Lymphoid screening; SST, small sample tube; PCD, plasma cell disorders; CLPD, chronic lymphoproliferative disorders.

Vedlegg 2: Anbefalte paneler fra EuroFlow for diagnose av KLL

Updated: 7 June 2019

EuroFlow antibody panels version 1.9



Panel 2. Composition of LST and technical information on reagents

	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
	CD20 and CD4	CD45	CD8 and Smlgλ	CD56 and Smlgκ	CD5	CD19 and TCRγδ	SmCD3	CD38
Marker	Fluorochrome	Clone	Source	Catalogue number	Application in EuroFlow panel		μl/test	
SmCD3	APC	SK7	BD Biosciences	345767	LST, SST, B-CLPD		2.5	
CD4	PacB	RPA-T4	BioLegend	300521	LST, B-CLPD, T-CLPD		0.5	
CD5	PerCPCy5.5	L17F12	BD Biosciences	341109	LST, T-ALL, B-CLPD		15	
CD8	FITC	UCH-T4	Cytognos	CYT-SLPC-50	LST, B-CLPD		20 (Part of LST mixture)	
CD19	PECy7	J3-119	Beckman Coulter	IM3628	LST, ALOT, SST, BCP-ALL, PCD, B-CLPD, MM-MRD, BCP-ALL MRD		5	
CD20	PacB	2H7	BioLegend	302320	LST, SST, BCP-ALL, B-CLPD, BCP-ALL MRD		1	
CD38	APCH7	HB7	BD Biosciences	EU: 656646 US: 653314	LST, SST, BCP-ALL, T-ALL, AML, B-CLPD		3	
CD45	PacO	HI30	Invitrogen	MHCD4530	LST, ALOT, SST, BCP-ALL, T-ALL, AML, B-CLPD, T-CLPD, NK-CLPD, BCP-ALL MRD		5	
CD56	PE	C5.9	Cytognos	CYT-SLPC-50	LST, B-CLPD		20 (Part of LST mixture)	
Smlgκ	PE	polyclonal	Cytognos	CYT-SLPC-50	LST, B-CLPD		20 (Part of LST mixture)	
Smlgλ	FITC	polyclonal	Cytognos	CYT-SLPC-50	LST, B-CLPD		20 (Part of LST mixture)	
TCRγδ	PECy7	11F2	BD Biosciences	EU: 655410 US: 655434	LST, B-CLPD		3	

Panel 8. Composition of B-CLPD and technical information on reagents

Tube	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
1	CD20 and CD4	CD45	CD8 and Smlgλ	CD56 and Smlgκ	CD5	CD19 and TCRγδ	SmCD3	CD38
2	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43
3	CD20	CD45	CD31	CD305	CD11c	CD19	SmlgM	CD81
4	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185	CD49d
5	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLADR	CD19	CD27	

Marker	Fluorochrome	Clone	Source	Catalogue number	Application in EuroFlow panel	μl/test
SmCD3	APC	SK7	BD Biosciences	345767	B-CLPD, SST, LST	2.5
CD4	PacB	RPA-T4	BioLegend	300521	B-CLPD, LST, T-CLPD	0.5
CD5	PerCPCy5.5	L17F12	BD Biosciences	341109	B-CLPD, LST, T-ALL	15
CD8	FITC	UCH-T4	Cytognos	CYT-SLPC-50	B-CLPD, LST	20 (part of LST mixture)
CD10	PE	ALB1	Beckman Coulter	A07760	B-CLPD	20
CD11c	PerCPCy5.5	B-Ly6	BD Biosciences	658330	B-CLPD	10
CD19	PECy7	J3-119	Beckman Coulter	IM3628	B-CLPD, ALOT, LST, SST, BCP-ALL, PCD, MM-MRD, BCP-ALL MRD	5
CD20	PacB	2H7	BioLegend	302320	B-CLPD, LST, SST, BCP-ALL, BCP-ALL MRD	1
CD22	PerCPCy5.5	S-HCL-1	BD Biosciences	658329	B-CLPD	25
CD23	FITC	MHM6	Dako	F7062	B-CLPD	2.5
CD27	APC	L128	BD Biosciences	337169	B-CLPD	2.5
CD31	FITC	WMS9	BD Biosciences	555445	B-CLPD	10
CD38	APCH7	HB7	BD Biosciences	EU: 656646 US: 653314	B-CLPD, LST, SST, BCP-ALL, AML	3
CD39	PE	TU66	BD Biosciences	555464	B-CLPD	10
CD43	APCH7	IG10	BD Biosciences	EU: 655407 US: 655430	B-CLPD	2.5
CD45	PacO	HI30	Invitrogen	MHCD4530	B-CLPD, ALOT, LST, SST, BCP-ALL, T-ALL, AML, T-CLPD, NK-CLPD, BCP-ALL MRD	5
CD49d	APCH7	9F10	BD Biosciences	EU: 658332	B-CLPD	1
CD56	PE	C5.9	Cytognos	CYT-SLPC-50	B-CLPD, LST	20 (part of LST mixture)
CD62L	FITC	SK11	BD Biosciences	347443	B-CLPD	2.5
CD79b	PerCPCy5.5	SN8	BD Biosciences	656644	B-CLPD	10
CD81	APCH7	JS-81	BD Biosciences	EU: 656647 US: 656154	B-CLPD, PCD, BCP-ALL	5
CD95	PE	DX2	BD Biosciences	555674	B-CLPD	20
CD103	FITC	Ber-ACT8	BD Biosciences	333155	B-CLPD	2
CD185	APC	51505	R&D Systems	FAB190A	B-CLPD	10
CD200	APC	OX104	eBioscience	17-9200	B-CLPD	1.25
CD305	PE	DX26	BD Biosciences	550811	B-CLPD	10
HLA-DR	PerCPCy5.5	L243	BD Biosciences	552764	B-CLPD, T-ALL	10
Smlgκ	PE	polyclonal	Cytognos	CYT-SLPC-50	B-CLPD, LST	20 (part of LST mixture)
Smlgλ	FITC	polyclonal	Cytognos	CYT-SLPC-50	B-CLPD, LST	20 (part of LST mixture)
SmlgM	APC	G20-127	BD Biosciences	551062	B-CLPD, BCP-ALL	10
TCRγδ	PECy7	11F2	BD Biosciences	EU: 655410 US: 655434	B-CLPD, LST	3

Vedlegg 3: Prosedyre for forbehandling og merking fra laboratoriet i Trondheim

Dokument «Immunfenotyping ved flowcytometri», ID 8482 - EQS

Immunfenotyping ved flowcytometri

Forfatter: Tone Kowalewski
Godkjent av: Turid Frødricksen

Gyldig fra: 31.08.2020
Revisjonsfrist: 31.08.2022

Revisjon: 2.10
ID: 8482

Hensikt og omfang

Prosedyren skal sikre optimale resultater ved merking av celler fra humant materiale med fluorescerende, mono- og polyklonale antistoffer.

Prosedyren omfatter prøvemateriale, utstyr, reagenser og fremgangsmåte for merking, samt utgivelse av svar.

Tilleggsopplysninger som angår spesielle analyseoppsett er bekrevet egne prosedyrer. Disse prosedyrene er ikke selvstendige dokumenter, men må benyttes sammen med denne prosedyren, se fanen relatert.

Fagområdet flowcytometri er i stadig utvikling og små, praktiske endringer i rutiner vil dokumenteres ved [Endringskontroll AMB, AMM, AIT, AP, LMK-stab](#) inntil prosedyre er revidert, samt på loggskjema som hører til de generelle og pasientspesifikke antistoffpanelene.

Grunnlagsinformasjon

Bakgrunn

Flowcytometri har utviklet seg til å bli et nyttig verktøy til diagnostikk og klassifisering av hematologiske sykdommer, og oppfølging av behandlingseffekt.

Dette skyldes utvikling av et bredt spekter av mono- og polyklonale antistoffer og fluorokromer i tillegg til tekniske nyvinninger.

Økt kunnskap om det normale cellebilde bl.a. i blod og benmarg bidrar til å øke forståelsen og identifisere unormale cellepopulasjoner.

Immunfenotyping utføres i tillegg til morfologisk og genetisk diagnostikk.

Indikasjoner

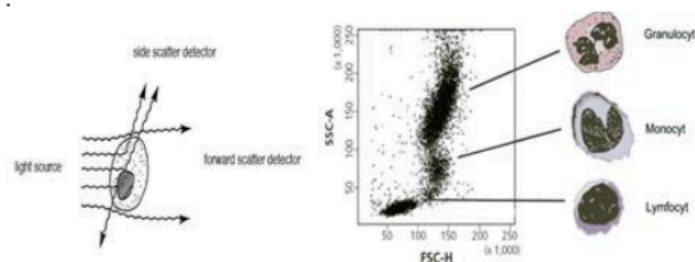
- ✓ Mistanke om hematologisk sykdom som bl.a. lymfom, leukemi og myelodysplastisk syndrom (MDS).
- ✓ Oppfølging av behandlingseffekt ved leukemi og lymfom.
- ✓ Avdekke minimal restsykdom (MRD - minimal residual disease).

Ansvar

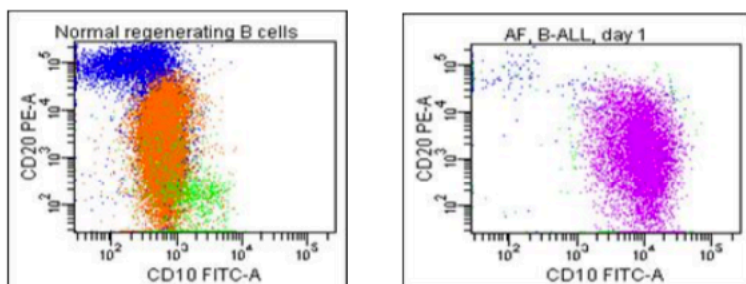
Bioingeniører og leger.

Analyseprinsipp

Immunfenotyping går ut på å identifisere og kvantifisere markører på celler i det de passerer ulike fotodetektorer i et flowcytometer. På en celle kan detektorene måle størrelse (forward scatter, FSC), kompleksitet (side scatter, SCC) og lysemisjon ved ulike bølgelengder samtidig.



Cellene blir merket med spesifikke mono- og polyklonale antistoffer konjugert med ulike fluorokromer som detekteres ved hjelp av laserlys.



Enkelte markører kan måles intracellulært eller på cellekjernen etter at celledmembranen er permeabilisert. Det gjelder markører som uttrykkes begge steder, eller bare intracellulært. Dette kan være naturlige uttrykk eller tegn på patologi.

Oppstartsdato

Analysen Immunfenotyping med to fluorokrommer ble startet opp 1997. I 2003 var standarden 3 fargepaneler. Analysen har etter hvert blitt standardisert med 4, 6 og nå er 8 fluorokrommer standard.

Svartid

Analysen utføres rutinemessig på dag- og kveldstid, mandag - fredag. Kan etter avtale med vakthavende lege rekvireres som hasteprobe, alle dager også lørdag, søndag og helligdager. Muntlig svartid ved hasteprover er samme dag.

Arbeidsbeskrivelse

Prøvemateriale

Prøvemateriale	Oppbevaring	Holdbarhet
EDTA-blod Benmarg Pleuravæske, ascites, ol	Romtemperatur (RT; 18 - 30°C)	Bør utføres innen 24 timer.
Celler fra lymfeknute på Transfix/EDTA Spinalvæske på Transfix/EDTA Etter ferdig analysering av EDTA- blod, Benmarg, Lymfeknute, Pleuravæske, ascites, ol kan rester av prøvemateriale settes på Transfix/EDTA.	Kjølerom (4 - 8°C)	48-72 t
BAL (Bronchoalveolar Lavage) Bronkialskyllvæske	Kjølerom (4 - 8°C)	4 timer

Tabell 1

Oppbevaring av prøvemateriale på Transfix/EDTA

Prøver som ikke kan merkes med antistoffer innen vurdert holdbarhetstid, settes på Transfix / EDTA.

TransFix®⁸ er en patentert preserveringsvæske som stabiliserer og preserverer benmarg, fullblod, lymfeknuder, spinalvæske og finnålsaspirat, og som bevarer overflateantigene inntil 10 dager oppbevart i kjølerom.

Intracellulær merking er anbefalt å utføre innen 3 dager pga lekkasje gjennom cellemembranen ved oppbevaring på denne preserveringsvæsken over lengre tid.

Utførelse:

1. Prøven skal telles på hematologisk instrument.
2. Ta ut ekstra etikett(er) fra LIMS.
3. Merk 1 - 3 Transfix / EDTA -rør (avhengig av mengde prøvemateriale og leukocyt-tall)
 - 3.1. Materiale ved stort prøvevolum (pleuravæske o.l) må sentrifugeres ved 540 g i 5 min med brems i 15 mL rør, eller uten brems i 50mL rør.
 - 3.2. Sug av supernatanten til det er 1-3 mL prøvemateriale igjen og bland godt opp.
4. Tilsett maks 1 mL av godt blandet prøvematerialet på hvert av de merkede rørene.
5. Rørene blandes ved å vende min 5 ganger.
6. Rørene oppbevares på kjølerom ved Enhet for cytometri.
7. Primærglasset oppbevares ved RT inntil analysering kan utføres.

Transfix tilsettes også prøver som allerede er merket, men hvor det ikke foreligger en konklusjon fra lege innen arbeidsdagens slutt.

Dette gjelder spesielt for benmarg og lymfeknute og andre prøver som ikke kan erstattes.

Blodprøver som er tatt samme dag, er vanligvis holdbare innenfor 24t.

Kontakt vakthavende lege for vurdering (se tabell 1).

Utførelse:

1. Merk 1 - 2 Transfix / EDTA -rør (avhengig av mengde prøvemateriale og leukocyt-tall)
2. Påfør om prøven er vasket og WBC etter vask.
3. Tilsett maks 1 mL av godt blandet prøvematerialet på hvert av de merkede rørene.
4. Rørene blandes ved å vende min 5 ganger.
5. Rørene oppbevares på kjølerom ved Enhet for cytometri.
6. Primærglasset oppbevares ved RT inntil svar er utlevert.

Før merking med antistoff:

1. La prøvemateriale på Transfix/ EDTA oppnå RT.
2. Vend rørene med prøveblandingen minimum 25 ganger.
3. Uvasket prøve før Transfix / EDTA- tilsetning vaskes 3 ganger før merking.
4. Vasket prøve før tilsetning Transfix / EDTA vaskes 1 gang før merking.

Analysering av prøven følger standard prosedyre etter hvilken merketeknikk som skal benyttes.

Prøve oppbevart på Transfix/ EDTA kan kastes etter analyse er verifisert i LIMS.

Analyseinstrument

Se prosedyre [FACSCanto II, bruk og vedlikehold](#) og [FACSLyric, oppstart og vedlikehold](#).

Utstyr

- ✓ Hematologisk analysemaskin for telling av WBC (Sysmex eller Advia eller ABX Micros).
- ✓ Falconrør.
- ✓ Sentrifuge.
- ✓ Minishaker.
- ✓ Prøvevippe.

- ✓ Pipetter m/ tip, 1 - 200 µL.
- ✓ Plastrør m/ lokk, 50mL.
- ✓ Filter :Falcon Cell Strainer 100 µm.
- ✓ Vacuette (hvit topp) eller annet rør uten tilsetting.
- ✓ FACS Lyse Wash Assistant (LWA).
- ✓ Sprøytefilter Minisart 0,45 steril.
- ✓ Utskrift av standard antistoff panelskjema.

Reagenser

For informasjon og fremstilling av reagenser se [Reagenser ved Enhet for cytometri](#).

pH er spesielt viktig på reagensene med oppgitt pH:

- ✓ PBS pH 7,3 ± 0,2.
- ✓ PBS/ 0,2% BSA og 2 mM EDTA pH 7,4.
- ✓ Lyseringsbuffer BD FACS lysing solution, bruksløsning.
- ✓ NH₄CL pH 7,3 In House lyseringsbuffer eller BD Pham lyse (NH₄CL uten formalin) bruksløsning.
- ✓ BD FACSDif.
- ✓ Fix & Perm cell permeabilization Kit.
- ✓ 3 mL rør TransFix / EDTA, lager på kjølerom ved Enhet for cytometri.

- ✓ Mono- og polyklonale antistoffer fra ulike leverandører;

Reagens	Oppbevaring	Holdbarhet	Bruk
Ubehandlet antistoff	Mørkt, i kjølerom (4 - 8 °C)	Exp. dato	I hht utprøving og anbefaling fra Euroflow benyttes varierende mengde mono- og polyklonale antistoff, avhengig av fluorokrom og leverandør.
Blanding av flere antistoff i "cocktail"	Mørkt, i kjølerom (4 - 8 °C)	4 uker, exp.date, se påskrift.	Følg anvisningene på de aktuelle antistoffpanel-skjema. Tillaging av cocktailer dokumenteres i: I:\STOLAV-
Fortynnet antistoff med steril FACSDif	Mørkt, i kjølerom (4 - 8 °C)	Varyerer, se antistoffpanel skjema.	Laboratoriemedisin\ AIT \ S-HEM og Imm \ Cytometri \ Kvalitet\ Analytisk kvalitet\ Føring for tillaging av cocktailer fortynninger mm

Tabell 2

NB!

Mono- og polyklonale antistoff som er utgått på dato fjernes fra bruks-eskene og lager. Hvis antistoff utgått på dato må benyttes i en utredning, skal det innhentes fravikstillatelse.

Kalibrator

Se [FACSCanto II, bruk og vedlikehold](#) og [FACSCanto II, Standardisering og kompensering](#).

Se [FACSLyric, oppstart og vedlikehold](#) og [FACSLyric, standardisering og kompensering](#).

Kvalitetskontroll

Alle daglige kalibreringer skal være godkjent.

- ✓ Daglig setup og kontroll, se [FACSCanto II, bruk og vedlikehold](#) og [FACSLyric, oppstart og vedlikehold](#).

- ✓ Kompensasjon, se [FACSCanto II, Standardisering og kompensering](#) og [FACSLyric, standardisering og kompensering](#).
- ✓ Interne kvalitetskontroller, se [Interne kvalitetskontroller ved Enhet for cytometri](#).
- ✓ Ekstern kvalitetsvurdering, se [Ekstern kvalitetsvurdering, Enhet for cytometri](#).

Ved unormale reaksjonsmønster varsler lege bioingeniør som repeterer oppsett som kontroll.

Prioritering og rekvirering av prøvene/prøvematerialet.

Prioritering av prøvene/prøvematerialet vurderes individuelt på grunnlag av:

- ✓ Rekvireringsopplysninger om hastegrad.
- ✓ Type prøvemateriale – antatt holdbarhet og muligheten til å fremskaffe nytt.
- ✓ Mulig diagnose – kronisk sykdom, akutt sykdom, B - celle sykdom, T - celle sykdom etc.

Ved tvil kontaktes vakthavende lege ved AIT for vurdering.

Valg av antistoffkombinasjoner

Det tas utgangspunkt i standardpaneler med ulike antistoffkombinasjoner som er tilpasset ulike diagnoser/utredninger.

Disse samsvarer med analysene på rekvireringen.

Papirutgave av standardpaneler benyttes som arbeidskjema for bioingeniør og lege.

Ved mottak av prøve foretar bioingeniør en vurdering mht til valg av antistoffpanel. Vurderingen foretas bl.a. på grunnlag av:

- ✓ Rekvirert analyse.
- ✓ Kliniske opplysninger fra rekvirent.
- ✓ Historikk med tidligere flowcytometri – analyser av pasient (inkl. pasientspesifikke antistoffkombinasjoner).
- ✓ MRD – analyse.

Hvis denne vurderingen ikke gir entydig konklusjon, eller prøvemateriale er cellefattig overlates den endelige vurderingen og eventuelle tilpasninger av antistoff panel til vakthavende lege.

Eventuelle tilpasninger og prøvespesifikke kommentarer skal noteres på det aktuelle standard panelskjemaet og som internkommentar i LIMS.

NB!

*For å forhindre misforståelser skal bioingeniøren ved nye antistoffkombinasjoner eller repetisjon av oppsett **ha skriftlig** beskjed fra vakthavende lege sammen med det **opprinnelige panelskjema**.*

Standardpanelene er utarbeidet og revidert av bioingeniører i samarbeid med ansvarlig lege.

Oppdaterte og gyldige versjoner av standard panelskjema med endringslogg ligger lagret på I:\stolav-laboratoriemedisin\AIT\S-Imm-Cyt\cytometri\Arbeidsskjemaer\Flowcytometri

Pasientspesifikke paneler og endringslogg ligger på

I:\STOLAV - Labbilder\FacsCanto\Cytometri\ PASIENTSPESIFIKKE MALER, hvor kun personell fra Enhet for cytometri og leger ved AIT har tilgang.

Behandling av prøvematerialet

- ✓ Blod telles før vask og merking. Se tabell 3.
- ✓ Benmarg og annet prøvemateriale som inneholder fnokker, koagler eller fragmenter filtreres vha. Falcon Cell Strainer 100 µL og 50 mL sentrifuge rør før telling og merking. Dette for å forhindre at hematologisk analysemaskin og flowcytometer tetter seg. Godt blandet og filtrert benmarg fortynnes 1:10 (50 µL + 450 µL) med FACSTFlow i

Vacuette rør (hvit topp) og sendes til telling før man skyller ut av filteret. Merk røret «1:10 marg». Skyll godt ut av filter og primærglasset, og ha det over i sentrifugerøret før det plasseres i sentrifugen.

- ✓ Videre klargjøring ved MRD myelomatose gjøres ved å følge prosedyre [MRD Myelomatose med NGF](#).
- ✓ Immunfenotyping ved PNH, se [Immunfenotyping ved PNH utredning](#).
- ✓ Broncoalveolar lavage (BAL) klargjøres og utføres ved å følge prosedyre [Immunfenotyping av Bronkialskyllvæske \(BAL\)](#).
- ✓ Spinalvæske, se [Immunfenotyping av spinalvæske](#).
- ✓ Lymfeknuter vaskes før telling, se tabell 3.

Seksjon Hematologi, ved Avdeling for Medisinsk Biokjemi utfører telling av leukocytter på instrument de finner mest hensiktsmessig i forhold til prøvemateriale:

Prøvemateriale	Før vask	Etter vask
EDTA-blod	Sysmex eller Advia Lurt å få sjekket om WBC må korrigeres for kjerneholdige erytrocytter.	Sysmex eller Advia eller Micros
Lymfeknute	NA	Sysmex eller Advia
Beinmarg og annet biologisk materiale	Sysmex	Sysmex I beinmarg må WBC korrigeres for kjerneholdige erytrocytter.
BAL	Advia	

Tabell 3

Vask av prøvematerialet

Vasket beinmarg kan hemolysere ved henstand til dagen etter, og må derfor analyseres samme dag. Uvasket beinmarg kan oppbevares i RT til dagen etter avhengig av prøvetidspunkt og grad av hasteanalyse, vurdering gjøres i samråd med vakthavende lege!

Prøvemateriale fra pasienter med **kuldeantistoff** vaskes **4 ganger med forvarmet PBS / 0,2%BSA og 2mM EDTA (37°C)**.

Om prøvene skal vaskes før merking avhenger av merketeknikk. Det benyttes ulike merketeknikker ved immunfenotyping.

[A - Stain, lyse and wash](#), vaske prøvematerialet før merking, lysering av prøvemateriale etter merking.

[B - Lyse, stain and wash](#), lysering og vask av prøvemateriale før merking.

[C - Intracellulær merking](#), benyttes etter enten A eller B merketeknikk.

[D - Merking av erytrocytter](#) er beskrevet [Immunfenotyping ved PNH utredning](#)

Vask av prøvemateriale med PBS / 0,2%BSA og 2mM EDTA før merking gjøres for å hindre uspesifikk binding av bl.a immunoglobuliner (både tunge og lette kjeder). Dette kan utføres på to måter:

Vask direkte i Falconrør

Prosedyren skal **ikke** utføres i **beinmarg**, og kan kun benyttes ved oppsett av få rør i blod og homogen lymfeknute, f.eks ved screeningsrør når man vil spare tid.

1. Merk Falconrørene med rørspesifikke sekundæretiketter.
2. Tilsett det volumet av prøvemateriale som tilsvarer $\leq 1,0 \times 10^6$ celler.

3. Tilsett minimum 2 mL PBS / 0,2%BSA og 2mM EDTA til hvert rør og sentrifuger ved 540g i 5 min **med brems**.
4. Sug av supernatanten og bland opp cellepellet.
5. Gjenta pkt 3 og 4 to ganger.(Prøven skal til slutt være vasket 3x.)
6. Resuspender cellene i FACSFlow til totalt volum er 80 µL.
7. Prøven er nå klar for merking med antistoff.
Se merking [med mono og polyklonale antistoff](#) fra pkt. 3.

Vask i 50 mL rør

Denne vaskeprosedyren skal benyttes ved undersøkelse av beinmarg og annet heterogent prøvemateriale.

Den er også hensiktsmessig når mange rør skal merkes.

1. Hell prøvematerialet over i et 50 mL sentrifugerør. (Ved mottak av beinmarg har vi allerede filtrert marginen over i sentrifugerøret.)
2. Skyll primærglasset gjentatte ganger med PBS / 0,2%BSA og 2mM EDTA, bruk vortex og hell over i 50 mL - røret.
3. Fyll røret med PBS / 0,2%BSA og 2mM EDTA opp til 50 mL - merket.
4. Sentrifuger ved 540g i 5 min u/ brems.
5. Sug av supernatanten og bland opp prøvematerialet.
6. Gjenta pkt. 3-5 to ganger. Totalt 3 vask.
7. Ved lavt celledtall tilsettes fortynningen (1:10 [se](#) pkt.2) av beinmarg før siste vask slik at alt prøvemateriale blir nyttegjort.
8. Etter siste vask overføres det vaskede materiale til et nytt glass uten tilsetning (Vacuette med hvit topp).
9. Merk røret med type materiale og WBC e/vask.
10. Send prøven til telling av leukocytter ^{tabell3}.
11. Noter WBC-tallet på prøveglasset og på arbeidsskjemaet/antistoffpanel-skjemaet. Dette benyttes **kun** for vurdering av prøvemengde pr. rør ved oppsettet .

Merketeknikker

A – Stain, Lyse and Wash

Merking med mono- og polyklonale antistoff

Totalvolumet av prøve og antistoff bør ikke overskride 120 µL. Dvs. max 80 µL av prøve²).

1. Merk Falconrørene med rørsesifikke sekundæretiketter.
2. Tilsett det volumet av vasket prøvemateriale som tilsvarer $\leq 1,0 \times 10^6$ celler til hvert rør.
 - 2.1. Ved cellerikt materiale $WBC < 50 \times 10^9/L$ tilsett FACSFlow til totalt volum er 50–80 µL, eksempelvis 20 mL prøve og 30 µL FACSFlow.
 - 2.2. Ved cellerikt materiale $WBC > 50 \times 10^9/L$ fortynn 1:5, eller 1:10 med FACSFlow. Tilsett det volumet som tilsvarer $1,0 \times 10^6$ celler til falconrørene, maks 80 µL.
3. Tilsett antistoff / antistoff fortynning / antistoff-cocktail til hvert rør i henhold til merking på rør og antistoffpanel-skjemaene.
4. Bland godt.
5. Inkuber lysbeskyttet ved RT i 30 min.

Lysering og vask, to likeverdige metoder:

Manuell lysering, vask og fiksering

1. Tilsett 2 mL BD lyseringsbuffer til alle rør.
2. Inkuber mørkt ved RT i 10 min.

3. Sentrifuger ved 540g i 5 min m/ brems.
4. Dekanter eller sug av supernatanten og rist opp cellepelleten godt.
5. Tilsett 2 – 3 mL PBS / BSA til alle rør.
6. Gjenta pkt. 3 og 4.
7. Tilsett ca. 200 µL FACSFlow til hvert rør ved screening og diagnose. Cellene er klare for registrering på flowytometeret. Benytt ca. 500 µL filtrert FACSFlow til hvert rør ved MRD.

Automatisk lysering, vask og fiksering

 [FACS Lyse/Wash Assistant, oppstart, bruk og vedlikehold. AIT.](#)

Preparering i LWA skal ikke utføres i lymfeknuter, MRD kontroller eller i prøver med lavt celletall.

1. Sett rørene over i en karusell som plasseres i i FACS Lyse/Wash Assistant
2. Velg aktuelt program i henhold til prøvemateriale og volum og følg anvisning.
3. Cellene er klare for registrering på flowcytometeret.

B – Lyse, Stain and Wash

Frengangsmåte benyttes ved merking av ett av de tre screeningsrør ved immunfenotyping (AcuteLeukemiaOrientationTube = ALOT-rør) og Plasmacellerørene P1 og P2.

1. Tilsett det volumet av uvasket prøvemateriale som tilsvarer $\leq 1,0 \times 10^6$ celler til spesifikt merkede Falconrør, maks 200 µL.
2. Tilsett 2 mL NH_4Cl lyseringsbuffer til røret.
3. Sett på topp og legg på vippe. Inkuber ved RT i 15 min.
4. Sentrifuger ved 540g i 5 min m/ brems.
5. Dekanter supernatanten og rist opp cellepelleten godt.
6. Tilsett 2 – 3 mL PBS / 0,2% BSA og 2mM EDTA.
7. Gjenta pkt. 4 – 6, slik at cellene får 2x vask etter lysering, men før merking.
8. Resuspender cellene i FACSFlow til totalt volum er 50–80 µL.
9. Følg deretter prosedyre for Intracellulær merking.

NB! Dersom prøvematerialet er vasket 3 ganger på forhånd, holder det med 1 x vask etter lysering. Benytt da 3 -4 mL vaskebuffer.

Lysering i 50 mL sentrifugerør (BULK lyse) før merking

Benyttes ved MRD Myelomatose og All together (A2G) protokoller fra NOPHO.

Se  [MRD Myelomatose med NGF](#)

C - Intracellulær merking

Intracellulære markører har "nu" eller "cy" som prefiks. Antistoffpanelene er ofte merket røde på disse markørene.

1. Prøven merkes først med antistoffer ekstracellulært, følg pkt. 1 – 5
Merking med mono- og polyklonale antistoff .
2. Tilsett 100 µL av reagens A (fikseringsmedium) fra Fix and Perm kit.
3. Bland godt!
4. Inkuber mørkt ved RT i 30 min.
5. Tilsett 2 mL PBS / 0,2% BSA og 2mM EDTA -bland godt og tilsett ytterligere 2 mL PBS / 0,2% BSA og 2mM EDTA. Sentrifuger ved 540g i 5 min m/ brems.
6. Sug av eller dekanter supernatanten og rist opp cellepelleten.
7. Tilsett 100 µL med reagens B (permeabilisering - og lyserings - medium).
8. Bland godt!
9. Tilsett antistoff for intracellulær merking jfr antistoffpanel-skjemaene til de aktuelle rørene og bland godt.
10. Inkuber mørkt ved RT i 20 min.

11. Gjenta pkt. 5 og 6.
8. Tilsett ca. 200 µl FACSFlow til hvert rør ved screening og diagnose. Cellene er klare for registrering på flowytometeret. Benytt ca. 500 µL filtrert FACSFlow til hvert rør ved MRD.

MRD analyse

Fenotypen til pasienter som skal følges opp ved MRD analyse avklares ved diagnosetidspunkt . Legene utarbeider LAIP skjema som basis for antistoff panel til MRD analyse. Dette finnes elektronisk og i mappen/permen til pasienten.

Ved MRD analyse vaskes hele benmargsprøven, se Vask i 50 mL rør (IKKE MRD Myelomatose). Margen må være så homogen som mulig da resultatene fra de ulike rørene sammenliknes innbyrdes og med evt. tidligere us.

Det er viktig å øke analysens **sensitivitet**, ved å øke antall events som registreres:

- ✓ MRD – leukemi og MCL: Samle inn >1 000 000 events av levende celler pr. rør om mulig.
- ✓ MRD – myelomatose: Se [MRD Myelomatose med NGF](#)

For å oppnå tilstrekkelig sensitivitet kan flere rør merkes med samme antistoffkombinasjon og slåes sammen før innsamling på flowcytometeret.

Hvis vi mottar lite prøvemateriale eller celletallet er for lavt til at en kan oppnå ønsket antall events, registreres så mange som mulig.

Lysering og vasking etter merking skal skje manuelt ved MRD analyse.

Innsamling av prøve (Acquisition) på flowcytometeret

For daglig oppstart, se [FACSCanto II, bruk og vedlikehold](#).

For registrering av data; se [FACSCanto II, Standardisering og kompensering](#) og [FACSCanto og FACSDiva software, rutinebruk](#).

Prøvene samles inn og analyseres så fort som mulig etter merking på flowcytometeret. Ved stor prøvemengde kan de oppbevares i kjølerom fram til de registreres, generell regel bør være ikke lengre enn 1 time.

Klargjør rør med FACSClean og filtrert FACSFlow til rensing av instrument før 1.rør MRD-kontroll, og benytt filtrert FACSFlow mellom rørene.

FACSCanto II

1. Åpne FACSDiva software
2. Hent fram «Eksperiment» tilsvarende antistoffpanel prøven er merket etter.
3. Merk «Eksperiment» med etternavn, fornavn, labnr og prøvemateriale.
Eksempel: Etternavn Fornavn Labnr_år_prøvemateriale.
4. Koble riktig Application Setting til eksperimentet.
5. Sjekk i «Eksperiment layout» at antall events stemmer (100 000 ved diagnose 1 000 000 ved kontroll av restsykdom, og 5 000 000 ved MRD myelomatose).
6. Gå på Edit -> Preferences-> Browse til riktig «adresse» på harddisk, og hak av for direkte overføring av FCS3-filer etter innsamling av hvert enkelt rør.
7. Hvis Carousel skal benyttes: Velg under «Carousel» Setup og id på karusell.
8. **Hastighet** på innsamlingen er avhengig av celletallet.
Optimal innsamling skjer ved «Medium Flow Rate». Ved for høy hastighet kan en få mange dubletter og miste verdifull informasjon. Ønsket events pr.sekund ca 1 000 – 2 000 (ikke absolutt). Ved Myelomatose kan events pr. sekund økes til 6000 – 9000.

FACSLyric

BCP-ALL A2G, BCP- ALL MRD A2G, T-ALL A2G, og T-ALL MRD A2G analyseres i FACSuite RUO.

Prøvene kan kjøres inn i enten **Worklist** eller i **Experiment**.

- ✓ Ved diagnose er det best å benytte **Worklist**, med innkjøring på rack. Det er som oftest kun standardrør og 200 000 events. Hvis det bestilles «pasientspesifikke» rør må **Experiment** brukes.
- ✓ Ved MRD vil det i de fleste tilfeller være best å gjøre innsamling i **Experiment**, fordi MRD paneler ofte har pasientspesifikke rør.

Hvis det er bare standardrør (som er i assayet) kan **Worklist** benyttes, men da må det velges **Loading options Manual** (på front, ikke rack), for å kunne stoppe manuelt når prøven er tom.

Worklist ved diagnose ALL

Pass på at det er minimum 400 µl i røret pga. *Stopping rules*.

1. Åpne FACSuite RUO.
2. Velg **Preferences > Worklists > FCS > Auto Export options**, hak av for *Export FCS files after acquisition > Naming Format, velg: Sample ID og Tube name*.
3. Velg hvor FCS filene skal eksporteres etter innkjøring:
C:/BDExport/FCS/ «år»/ «aktuell»mappe»/ «Worklist name», som lages ny for hver prøve ved å klikke på **make a new Folder**. Navngi folderen med: **Navn, Beaker-ID og materiale**.
4. Åpne **Worklist**, klikk på **Manage worklist > New**.
5. Under **Worklist Entries**, velg aktuell **Task**, eks.: *BCP ALL A2G*.
6. **File > Reame Worklist**; «*Navn, Beaker-ID, materiale*».
7. **Sample ID**, skan/skriv inn Beaker-ID.
8. **Loading Options**, velg riktig Carrier Type (30 Tube Rack)
9. Hvis ikke alle rørene i task skal kjøres, merker man kun de aktuelle rørene i **Layout view** (Ctr + klikk).
10. Klikk **RUN**, og velg det som er aktuelt (run from pointer, Run all, eller run selected).
11. **Overfør til C:/** ved å klikke på **Approved**. Filene blir da overført til «Worklist name» (se pkt 2). Kan også overføres på en annen måte ved å merke fil(ene) i worklist, klikke på **File > Export > FCS filer**, og velg plassering under «worklist name».
12. **Overfør til X:/** ved å velge **Home > Copy to > Choose Location**, velg riktig mappe (eks: *X:/FACSCanto/2020/Akutt leukemi*).

Experiment, ved MRD og prøver med pasientspesifikke rør

1. Åpne FACSuite RUO.
2. Stå i riktig mappe i **Experiment** browser *Administrator > Akutt leukemi, MRD, osv*.
3. Klikk på **New > new from Assay > velg aktuelt assay**
4. Rename experiment (fil > rename): *Navn, labnr/år, materiale*.
5. Se over at de rørene du trenger er der.
6. Hvis pasientspesifikke rør må lages, gjør som følgende:
 - ✓ **Duplicate without data** eller *copy* et rør som ligner (eller endre et som ikke skal brukes).
 - ✓ Høyreklikk på røret, klikk så på **Properties**.

- ✓ I vinduet **Tube Properties** velg fanen **General** og endre *Tube name* til riktig markørkombinasjon. Endre så til riktig *Tube setting* (A2G-..., iht. fluorochromkombinasjon).
 - ✓ Gå så på fanen **Parameters** og velg riktig fluorochromes.
 - ✓ Gå deretter til fanen **Reagens** og velg riktig Labels (Husk å velge riktig lot.nr for spesifikk kompenserte ab).
 - ✓ Sjekk til slutt at **acquisition rules** stemmer og at **Spillover Values** (SOV's) for alle parameter er hentet inn. Lukk vinduet.
7. Stå på **Sample ID**, scan Beaker ID. Gjør dette for alle rør.
 8. Start først ved å se på **Preview**, sjekk at antall events/sek ikke overskrider 35.000 (hvis høyere må flowrate stilles ned)
 9. Sjekk at gatene er i riktige posisjoner (rundt sine respektive populasjoner).
 10. Klikk så **Aquire**, og innsamling starter.
 11. Overfør filene til C:/ ved å gå på **File > Export > FCS filer**, klikk **Make new folder**. Velg plassering, eks: *C:/BDEExport/FCS 2020/MRD*. Navngi folder(mappe) med *Navn, Beaker ID, materiale*, klikk Enter og OK, og filene går over i mappa.
 12. Overføring til X:/ som for *Worklists*.

Dersom noen av antistoffene er helt nye og ikke finnes i Library, må disse legges inn, først under *Labels* og der etter under *Reagens*.

OBS! Følg nomenklatur fra EuroFlow (jfr. *Uniform coding of markers and fluorochromes*, mars 2019).

Et hjelpemiddel for å unngå for mange dubletter er "**racking**" av rør mot stativ før innkjøring eller vortex-mix.

Håndtering og analysering av data

Etter innsamling av alle rørene, sjekkes filene for riktig KB pr fil. 100 000 events ligger på 5 000 KB, 1 000 000 ligger på 50 000 KB, og 5 000 000 ligger rundt 275 000 KB. Det har hendt at store filer ikke har blitt riktig overført.

Hele mappen kopieres over til internt nettverk, på instrumentpc heter banen X:\FACSCanto\årstall\analyse-diagnose, (på PULS pc I:\STOLAV - Labbilder\FacsCanto\årstall\analyse-diagnose), etter påføring av FCS3 bak mappenavnet.

«Filbanen» føres på antistoffpanel-skjema som leveres med utskrift fra hematologi-instrumentene og relevante oversiktsplot til vakthavende lege ved AIT.

Bioingeniør legger inn «Metode» (hvilket instrument prøven er analysert på) i LIMS før levering til vakthavende lege.

Analysering av data utføres av vakthavende lege.

Et vanlig utgangspunkt for en mal eller strategi er skissert under:

1. Debris og dubletter ekskluderes basert på FSC/SSC dotplot.
2. Normale lymfocytter benyttes som intern referanse for nedre FSC "gate" (events mindre enn lymfocytstørrelse ekskluderes).
3. Cellepopulasjoner "gates" ut vha linjemarkører, CD45 og SSC/FSC.
4. Normale celler tilstede i prøven benyttes som interne referanser for "gater".

For MRD:

1. Prøven er positiv hvis det påvises minimum 10 celler, samlet som et cluster med abberant fenotype og passende scatteregenskaper.
Det må bekreftes at clusteret har en "Leukemia - Assosiated ImmunoPhenotype" (LAIP) i alle relevante plot.
2. Resultatene anses som mer sikre ("kvantiterbare") hvis mer enn 30 – 50 events med LAIP er påvist, og / eller det sees i flere rør (kombinasjoner).
3. For optimal sensitivitet ($< 10^{-4}$) skal det være analysert mer enn 1×10^6 celler pr. kombinasjon (optimal sensitivitet forutsetter at de leukemiske cellene har en klar LAIP).

For spinalvæske-prøver ved spørsmål om B-cellelymfom [Immundefotyping av spinalvæske](#):

1. Prøven er positiv hvis det påvises minimum 10 B-celler, samlet som et cluster med abberant fenotype og passende scatteregenskaper. Det må bekreftes at celleclusteret har en LAIP i alle relevante plot.
Funnnet må verifiseres ved analyse på restmaterialet. Primært velges SST rør hvis få events, eventuelt mer spesifikt B-cellerør.
2. Resultatene anses som mer sikre ("kvantiterbare") hvis mer enn 30 – 50 events med LAIP er påvist og / eller det sees i flere rør (kombinasjoner).

Legene foretar en vurdering av resultatet og gir en skriftlig besvarelse av prøven under analysekommentar i labdatasystemet. De velger også evt plot som skal arkiveres. Hvis prøven besvares av Leger i spesialisering skal vurdering, besvarelse og konklusjon vurderes av bakvakt (overlege).

Svarrapport bør inneholde:

1. Om det påvises abnormale celler, og i så fall immunfenotype med evt intensitet (svakt / moderat / sterkt / heterogent) der det er relevant.
2. Hvis ikke abnormale populasjoner påvises kan evt differensialtelling av normale populasjoner oppgis.
3. Evt ratio av CD4/CD8 og kappa/lambda kan oppgis der det er relevant.
4. Hvis evt maligne funn skal klassifiseres skal "*WHO classification of tumors*"⁽⁵⁾ benyttes der det er relevant / eller mulig.

Alle leger som har vurdert besvarelsen kan signere på antistoff panel skjema. Besvarelse leveres sammen med øvrig dokumentasjon til Enhet for cytometri. Lege som besvarer en test vil ha sin elektroniske signatur i LIMS.

Utgivelse av svar

Legene ved avdelingen går igjennom besvarelsene på morgenmøtet. Følgende blir kontrollert:

- ✓ Rett prøvemateriale.
- ✓ Besvarelsen skrevet på rett test.
- ✓ Immunfenotype og konklusjon.

En annen lege enn den som har besvart testen utfører endelig verifisering av besvarelsen. Dette gir 2 elektroniske signaturer for besvarelsen i LIMS (den som har besvart og den som har verifisert).

Kopi av besvarelsen leveres sammen med alle plot og øvrig dokumentasjon (antistoffpanel, analyseplot, hematologiutskrift etc) til Enhet for Cytometri.

Bioingeniør går over tester som er verifisert av legene, samt legger inn «Metode» for etter rekvirerte tester på samme prøve og verifiserer. Arkiverer all dokumentasjon i permer ved avdelingen.

Utestændeliste sjekkes jevnlig gjennom arbeidsdagen.

Måleområde

Nedre deteksjonsgrense er relevant ved MRD eller ved analyse av spinalvæske.

- ✓ Positiv prøve: Cluster av ≥ 10 events av celler med abberant fenotype.
- ✓ Sikker positiv: Cluster av 30 - 50 events av celler med abberant fenotype og konfirmert med andre antistoff kombinasjoner.
- ✓ MRD (marg): 10^{-4} og 10^{-5} , forutsatt at 1×10^6 celler og 10×10^6 celler er analysert.

Feilkilder

- ✓ Prøvematerialet Ikke optimalt mht homogenisering, holdbarhet, viabilitet, antikoagulans, evt. koagler, forsendelse.
Kan gi dårlig samsvar mellom rørene i analyseoppsettet.
- ✓ Mono og polyklonale antistoffer mht. fluorokromer, kloner, metning i ab/ag.
 - For mye antistoff tilsatt kan hindre god separasjon mellom positiv og negativ populasjon.
 - For lite antistoff tilsatt kan gi dårlig metning og kan gi falske negative populasjoner.
 - Dårlig vask før merking kan gi falsk negativ Kappa og Lambda.
- ✓ Fluorescenseintensitet fra antistoffer varierer og uvante kombinasjoner kan gi tilsvarende resultater.
- ✓ Standardisering og kalibrering av flowcytometere ikke optimal. Kan skyldes drift av lasere. Kan føre til endret MFI, spesielt kritisk ved MRD.
- ✓ Variabel grad av hemolysering.
- ✓ Feil antistoff / manglende antistoff tilsatt.
- ✓ Umerket populasjon. Det skal ikke være rester av prøvematerialet langs sidene av Falconrøret ved pipettering.

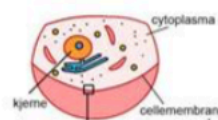
Referanser

1. EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Sample preparation and staining, Version 1.4 (25th June 2018).
2. EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Sample preparation and staining, Version 1.5 (19 August 2019).
3. Helsedirektoratet. Nasjonalt handlingsprogram for diagnostikk , behandling og oppfølging av maligne blodsykdommer IS-2746(27.09.18).
<https://helsedirektoratet.no/retningslinjer/nasjonalt-handlingsprogram-med-retningslinjer-for-diagnostikk-behandling-og-oppfolging-av-maligne-blodsykdommer>
4. Helsedirektoratet. Nasjonalt handlingsprogram for diagnostikk , behandling og oppfølging av maligne lymfomer IS-2747 (09.01.19). <https://helsedirektoratet.no/retningslinjer/nasjonalt-handlingsprogram-med-retningslinjer-for-diagnostikk-behandling-og-oppfolging-av-maligne-lymfomer>
5. Helsedirektoratet. Nasjonalt handlingsprogram for diagnostikk , behandling og oppfølging av kreft hos barn IS-2586 (10.01.17).
<https://helsedirektoratet.no/retningslinjer/nasjonalt-handlingsprogram-med-retningslinjer-for-diagnostikk-behandling-og-oppfolging-av-kreft-hos-barn>
6. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Revised 4th Edition.2017.
7. NOPHO-ALL2008 and coming ALLTogether protocol.
8. CLSI "Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Approved Guideline- Second Edition" H43-A2, Vol.27 No11
9. Perm på Enhet for cytometri:
 - a. Produktbeskrivelse for ulike monoklonale antistoffer
 - b. Produktbeskrivelse TransFix.
 - c. Produktbeskrivelse Fix & Perm Cell Permeabilization Kit.

Innledning





Celler har et stort spekter av molekyler som reagerer med antistoff. De kan uttrykkes på

celleoverflaten som membranbundne antigen, på cellekjernen som nukleære (nu) antigen og intracellulært som cytoplasmatiske (cy) antigen.



Celler som stammer fra primære stamceller i benmargen har et eget markørsystem som beskrives ved den såkalte CD-nomenklaturen (Cluster of Differentiation). Cellene kan klassifiseres for differensieringslinje og modningstrinn ved hjelp av ulike kombinasjoner av slike markører. Kreftceller (leukemi- og lymfocytter) er i tillegg til sterk cellevekst, ofte karakterisert av en avvikende kombinasjon av markører i forhold til celler med normal modning og differensiering. Korrekt klassifisering av slike celler har stor interesse med henblikk på prognose og behandling av pasientene.

Relaterte dokumenter:

-  [FACS Lyse/Wash Assistant, oppstart, bruk og vedlikehold. AIT](#)
-  [FACSCanto II, bruk og vedlikehold](#)
-  [FACSCanto II, Standardisering og kompensering](#)
-  [FACSCanto og FACSDiva software, rutinebruk](#)
-  [FACSLyric, konfigurasjon](#)
-  [FACSLyric, oppstart og vedlikehold](#)
-  [FACSLyric, standardisering og kompensering](#)
-  [Immunfenotyping av Bronkialskyllévæske \(BAL\)](#)
-  [Immunfenotyping av spinalvæske](#)
-  [Immunfenotyping ved PNH utredning](#)
-  [Reagenser ved Enhet for cytometri](#)

Relaterte vedlegg:

-  [Sjekkliste for Immunfenotyping](#)

Vedlegg 4: Panel med rør som benyttes ved mistanke om KLL ved laboratoriet i Trondheim

LYMFOPROLIFERATIV																		
Etikett:		Dato:					Instrument:											
		Sign lege(r):					Lyseringsmetode:											
							WBC: $\times 10^3/L$											
							WBC/analyserør: $\times 10^5/rør$											
							Kommentar:											
							<input type="checkbox"/> Filene eksportert til X:\											
							Sign bioing:											
Antistoffkombinasjon																		
Dato	Rør	FITC	μl	PE	μl	PerCP-CY5.5	μl	PE-Cy7	μl	APC	μl	APC-Cy7 (1)/ APC-H7 (2)/ APC-C750 (3)	μl	PB (1) / V450 (2)/ eFluor450 (3)/ BV421 (4)	μl	V500-C (1)/ OCS15 (2)/ BV510 (3)	μl	Rutineanalyse: 100 000 events
	LST	CD8 og Lambda	2,5	CD56 og kappa	2,5	CD5	15	CD19 og TCRgd	2,5	CD3	2,5	CD38 (2)	2,5	CD20(3) og CD4 (1)	2,5	CD45 (1)	2,5	LST screening (1 000 000 v/ MRD)
	B-1	CD23	2,5	CD10	10	CD79b	2,5	CD19	2,5	CD200	5	CD43 (2)	2,5	CD20 (3)	2,5	CD45 (1)	2,5	CLL vs andre
	B-2			CD103	5	CD11c	2,5	CD19	2,5	CD22	2,5	CD81 (2)	2,5	FMC7 (2)	5	CD45 (1)	2,5	Klassifisering
	B-3	IgD	5	CD25	10	CD27	10	CD19	2,5	IgM	5	CD38 (2)	2,5	CD20 (3)	2,5	CD45 (1)	2,5	Bcl1 switch/memory / IgG4 rel disease (1 000 000)
	B-4	Kappa		Lambda	2,5	CD5	15	CD19	2,5	CD10	2,5	CD38 (2)	2,5	CD20 (3)	2,5	CD45 (1)	2,5	FolL Lymfom (1 000 000 v/ MRD)
	B-5	Kappa		Lambda	2,5	CD5	15	CD19	2,5	CD200	5	CD43 (2)	2,5	CD20 (3)	2,5	CD45 (1)	2,5	MLL (1 000 000 v/ MRD)
	T-1	CD8	2,5	CD7	5	CD3	5	CD2	2,5	CD5	2,5			CD4 (1)	2,5	CD45 (1)	2,5	T-c-Panantigen
	T-2		5	CD30	5	CD3	5	CD56	2,5	CD326	1			CD20 (3)	2,5	CD45 (1)	2,5	Anaplasisk
	MF	CD8	2,5	CD26	10	CD3	5	CD56	2,5	CD7	2,5	CD19 (2)	5	CD4 (1)	2,5	CD45 (1)	2,5	Macrosi Fungoides/Sezary
	NK1	CD57	5	CD26	10	CD3	5	CD56	2,5	CD7	2,5	CD19 (2)	5	CD4 (1)	2,5	CD45 (1)	2,5	aberrant NK
	NK2	cy Perforin*	10	cy Granzyme*	20	CD3	5	CD56	2,5	CD94	5	CD19 (2)	5	HLADR (2)	2,5	CD45 (1)	2,5	aberrant NK/cytotox * Intracellulær metode.
	P1	CD38	5	CD56	2	CD45	1	CD19	4	CD117	4,2	CD81 (3)	5	CD138 (4)	2	CD27 (3)	8	MRD myelomatose har eget panelark
	P2	CD38	5	CD56	2	CD45	1	CD19	4	cyIgK*	4,2	cyIgL* (3)	2,5	CD138 (4)	2	CD27 (3)	8	

LST: Benytt 20 μl av cocktail, tilsett PerCP-Cy5.5, PE-Cy7 og APC-Cy7/H7 i tillegg.
 B1 cocktail: Benytt 25 μl av mix, tilsett PE-CY7 og APC-Cy7/H7 i tillegg.
 Antistoff i skuffe merket A2G/CAR-T/MM MRD/PC

Panel sist endret: 05.05.21

Tillaging av cocktailer: I:\STOLAV - Laboratoriemedisin\AIT\5-Imm-Cyt\Cytometri\Kvalitet\Analytisk kvalitet Tilhører EQS-prosedyre 8482 "Immunfenotyping ved flowcytometri"

Vedlegg 5: Prosedyre for forbehandling og merking fra laboratoriet i Bergen

	Flowcytometrisk immunfenotyping av leukocytter - Euroflow metode		Prosedyre
	Kategori: Laboratorieundersøkelser		
Organisasjonsplassering: Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin/Seksjon for flowcytometri	Forfatter: Sølvi H. Eidheim og Jannike L. Sælen	Dok-ID: AIT-57604	Version: 3.03 Gyldig fra: 23.10.2020
Dok. eier: Kari Iversen Dyrdal	Dok. ansvarlig: Knut Liseth	Gyldig til: 23.10.2021	

Endringlogg

Versjonsnummer	Endring i denne versjonen
3.03	16.10.2020 HANLIT: La til en setning som at en kan benytte vasket blod fra dagen før. 23.10.2020 HANLIT: Fjernet spinalvæske som prøvemateriale. Forlenget gyldighet til 23.10.2021

Hensikt

Prosedyren beskriver hvordan vi ved hjelp av flowcytometrisk analyse kan undersøke hvilke antigener som uttrykkes på overflaten og intracellulært hos leukocytter. Metoden brukes til immunfenotyping av leukemier og andre hematologiske tilstander. Analyseres på multiparameter flowcytometer (BD FACS Canto II) i BD FACSDiva Software. Vi følger «Euroflow Standard Operating Procedure» (SOP) for «Sample preparation and staining» når prøver skal settes opp med Euroflow paneler (se tabell med oversikt over Euroflow paneler til slutt i prosedyren).

Omfang

Forarbeid; vasking og merking av celler, analysering på flowcytometer FACSCanto II.

Målgruppe

Bioingeniører og teknisk personell som jobber på Flowlaboratoriet.
Immunfenotyping av leukocytter står i NIVÅ 2 i opplæringsprogrammet.

Innhold

1	Medisinsk problemstilling	1
2	Prinsipp	2
3	Prøvemateriale	2
4	Utstyr	3
5	Reagenser	3
6	Fremgangsmåte	4
6.1	Prøvepreparering/forvask (EF PROSEDYRE 2)	5
6.2	Merking av kun overflateantigener (EF PROSEDYRE 4)	6
6.3	Merking av overflate- og intracellulære antigener (EF PROSEDYRE 5)	6
6.4	Nukleær (nu)TdT-merking (Kun til AML/MDS4). (EF PROSEDYRE 6)	7
7	Innkjøring på flowcytometer	8
8	Kvalitetskontroller	8
9	Resultater	9
10	Måleusikkerhet	9
11	Metodebegrensning	9
12	Feilkilder	9

1 Medisinsk problemstilling

For gruppering og sub-gruppering av leukemier kan immunfenotyping være av avgjørende betydning. Korrekt klassifikasjon har betydning for valg av behandling og for vurdering av pasientens prognose. Noen ganger er det vanskelig entydig å stadfeste linjetilhørighet og modningsgrad basert kun på tilstedeværelse av overflateantigener. Særlig gjelder dette for umodne T- og B-celler. Påvisning av

 HELSE BERGEN	Flowcytometrisk immunfenotyping av leukocytter - Euroflow metode	Prosedyre
Gyldig til: 23.10.2021	Versjon: 3.03	Dok-ID: AIT-57604

cytoplasmatisk CD3 er spesifikt for T-celler. Cytoplasmatisk CD22 og CD79a er spesifikke markører for B-celler, særlig med samtidig overflate CD19. Enzymet TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) er nyttig for å stadfeste modningsgrad av cellene. Intracellulær myeloperoksidase, MPO, indikerer en myeloid linjetilhørighet.

Ved følgende problemstillinger/paneler finnes egne prosedyrer:

Immunsvikt og COVID (PIDOT): [AIT-22430 Immunsvikt og COVID](#)

PNH (4G): [AIT-18312 Multiparameter Flowcytometri av Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria \(PNH\)](#)

BAL(6G): [AIT-21002 Bronchoalveolar lavage \(BAL\)](#)

RTE (7G): [AIT-25671 Recent thymic emigrants \(RTE\)](#)

Trombocytdefekter: [AIT-58013 Utredning av trombocytdefekter](#)

T-reg: }

Axl: } [AIT-45486 T-REG & AML-AXL](#)

HLA-B7: [AIT-43405 Flowcytometrisk bestemmelse av HLA-B27 /B7 med tanke på kryssreaksjon](#)

CD34 dual platform: [AIT-19714 Kvantitering av CD34 \(Stamceller\)](#)

Alle Transfusjonsanalyser

2 Prinsipp

Fluorescens-merkete monoklonale antistoffer, mot aktuelle cellemarkører avhengig av den leukemitype det er mistanke om, benyttes i flowcytometrisk analyse for å undersøke pasientens leukocytter. Kliniske opplysninger er helt avgjørende for riktig valg av antistoffpanel.

For å kunne påvise cytoplasmatisk eller kjerneantigen er det nødvendig å permeabilisere cellemembranen slik at antistoffet kan passere. Fix&Perm™ (Nordic –Mubio) er et fikserings- og permeabiliseringsreagens til bruk for å preparere leukocytene før tilsetning av intracellulære antistoffer.

3 Prøvematerial

Alle typer prøver som skal til immunfenotyping må sendes laboratoriet snarest. Det er viktig at prøven holdes ved romtemperatur hele tiden. Prøver som kommer i sprøyte skal overføres til plastrør og blandes ved ankomst til laboratoriet. Dersom blodprøver og beinmargsprøver ikke kan analyseres innen rimelig tid kan prøvene tilsettes fiksering. Se [AIT-29470 Preservering av hvite blodceller for senere analyse](#). Prøvene er da holdbar i inntil 7 dager, fiksering er spesielt egnet for lymfocytter.

EDTA-fullblod (2-4 mL). Blandes godt. Holdes ved romtemperatur før oppsett. Bør sendes laboratoriet umiddelbart. Må ikke utsettes for kuldegrader under transport (eksterne prøver), da dette kan gi hemolyse. Hemolyserte prøver kan ikke brukes.


Beinmargspirat. Ved prøvetaking aspireres beinmargen i heparinisert sprøyte. Heparin uten konserveringsmiddel 5000 IE/mL er optimalt. Minst 0,1mL heparin pr. mL beinmarg. Blandes umiddelbart i sprøyten, overføres til prøverør og sendes ved romtemperatur til laboratoriet straks etter prøvetaking.

Beinmargsbiospi. Ved «dry tap» kan det sendes biospi av beinmarg. Den sendes i glass med fysiologisk saltvann.

Bronchialskvlevæske.

Se [AIT-21002 Bronchoalveolar lavage \(BAL\)](#).

Ascites og andre biologiske væsker.

 HELSE BERGEN	Flowcytometrisk immunfenotyping av leukocytter - Euroflow metode	Prosedyre
Gyldig til: 23.10.2021	Versjon: 3.03	Dok-ID: AIT-57604

4 Utstyr

- Plastrør 5 mL – Falcon polystyren 12x75 mm, ref.nr. 352052.
- 10 mL sentrifugerør – rund bunn (Thermo Scientific fra Heger), ref.nr 142AS.
- Vippemaskin
- Pipetter: 0,5-10 µL, 10-20 µL, 100-1000 µL, 1-5 mL
- Rotasjonsmixer (whirl-mixer)
- Sentrifuge, Hettich Universal 320 eller 320 R. Se [AIT-28229 Bruk av Hettich sentrifuge Universal 320 og 320R](#) og [AIT-32002 Sentrifugeprogram for Hettich Universal 320 og 320R sentrifuge](#).
- Flowcytometer-BD FACSCanto II, med Euroflow konfigurasjon. Se [AIT-10070 FACSCanto flowcytometer](#)
- Medimaskin, Regnr. 36501
- Varmeskap, 37 °C (ved kuldeagglutinin syndrom), Regnr. 334406.301
- 30 µm filter, BD refnr 340599
- Sprøyter 5 mL, BD refnr. 309649
- Sprøytespiss 14G, KD-FINE refnr. 914076

5 Reagenser

Se [AIT-10211 Kjemikalierregister AIT](#) og EcoOnline. Husk å fylle ut dokumentasjonsskjema der det lages egenproduserte løsninger/fortynninger: [AIT-59464 Dokumentasjonsskjema egenproduksjon/fortynning AIT](#), se prosedyre [AIT-63254](#).

- BD FACS Lysing Solution, refnr. 349202 eller 340183 (Fortynnet 1:10 med destillert vann). **HELSESKADELIG ved hudkontakt og innånding. Kan forårsake kreft. Lag fortynning i avtrekk. Bruk hansker og jobb videre i avtrekk med 1:10 fortynning. Bruk vakuum-system ved fjerning av supernatant. Tom emballasje kastes i rød avfallsdunk. Rest av fortynning kastes i egen kanne i rød avfallsdunk.**
Holdbarhet ufortynnet (v/2-25°), se merking på flaske.
Holdbarhet fortynnet 1:10 (v/romtemperatur), 1 mnd.
Husk å merke flasken med navn, produksjonsdato, holdbarhet og nødvendig faremerking i henhold til [AIT-10211 Kjemikalierregister AIT](#).
- Fix&Perm™, Nordic –Mubio, refnr. GAS-002-1
Solution A: HELSESKADELIG ved hudkontakt. Gir alvorlig øyeskade. Kan forårsake kreft. Bruk hansker. Arbeid i avtrekk. Bruk vakuum-system ved fjerning av supernatant. Tom emballasje sorteres som vanlig avfall.
Holdbarhet (v/18-24°C): Se merking på flaske.
- Euroflow SOP vaskebuffer, se [AIT-57594 Vaskebuffer til Euroflow SOP](#)
Vi har fast bestilling på vaskebuffer 1. torsdag i mnd. (må hentes på kjølerom i 4.etg)
Vaskebuffer må være romtemperert før bruk.
Bruk hansker. Giftig for liv i vann. Bruk vakuum-system ved fjerning av supernatant. Klassifisert som farlig avfall. Rester kastes i egen oppsamlingsdunk i rød avfallsboks. Glassflasker med blå kork skal tilbake til MIA for vask og gjenbruk, faremerket må IKKE fjernes!
Holdbarhet: 2 mnd etter produksjonsdato

 HELSE BERGEN	Flowcytometrisk immunfenotyping av leukocytter - Euroflow metode	Prosedyre
Gyldig til: 23.10.2021	Versjon: 3.03	Dok-ID: AIT-57604

- BD FACSCFlow, Refnr. 342003
- dH₂O (Aqua B. Braun fra apoteket), refnr. 0082479E
- Antistoffblandinger (varierer for de ulike oppsett):
 - Frysetørret antistoffrør uten «drop-in» PE-kanal brukes til BCP-ALL-MRD1 + BCP-ALL-MRD2
Refnr.: **CYTOGNOS BCP-ALL MRD**, oppbevares i kjøleskap.
Løses opp i 310 µL destillert vann (6 porsjoner a 50 µL), blandes godt og legges på vippe i 30 min i RT.
Holdbar 1 mnd (i kjøleskap) etter oppløst i dest. vann.
(Alternativt reagens: CYTOGNOS BCP-ALL MRD7 med «drop-in»)
 - Frysetørret antistoffrør med «drop-in» i 3 kanaler.
Refnr.: BD Dried Stain 455, oppbevares i romtemperatur (høyskap).
 - Antistoffblanding som lages manuelt:
Se prosedyre; [AIT-24238 Tillaging av antistoffpaneler](#).

For oversikt over antistoffer i beholdningen og blandinger i bruk;
[AIT-58306 Antistoff - hovedliste og arbeidsark](#)

6 Fremgangsmåte

Mottak av prøver, følg: [AIT-45070 Rekvirering/ besvarelse/ arkivering - utvidet immunfenotyping](#).

For å bestemme hvilke paneler som skal settes opp følg [AIT-24279 Problemstilling - Strategi ved oppsett av immunfenotyping](#).

Arbeidsark som skal fylles ut og brukes underveis:

Alle prøver	AIT-59922 Arbeidsark til immunfenotyping- Screening
Prøver som settes opp med BCP-ALL MRD eller T-ALL paneler	AIT-58306 Antistoff - hovedliste og arbeidsark (Finn ark i perm merket «Arbeidsark ALLTogether MRD» eller skriv ut arbeidsark direkte fra EK, for de paneler som skal settes opp)

Alle arbeidsark skal arkiveres i plastlomme sammen med pasientresultater (utskrifter fra flowcytometer).

 HELSE BERGEN	Flowcytometrisk immunfenotyping av leukocytter - Euroflow metode	Prosedyre
Gyldig til: 23.10.2021	Versjon: 3.03	Dok-ID: AIT-57604

Beinmarger

Forvask: Beinmarger skal forvaskes x 1

Unntak: ALL-MRD-prøver krever bulklysering og skal ikke forvaskes!

Følg da prosedyre [AIT-58856 Flowcytometrisk immunfenotyping - ALLTogether](#).

Filtrering:

Beinmarger som etter vask fortsatt inneholder mikrokoagler eller fibrin må filtreres med sprøyte og 30 µm filter. Fyll da røret opp til ca. 5 mL med vaskebuffer før filtrering. Filtrer over i nytt 10 mL rør og etterskyll så røret med 4-5 mL vaskebuffer og filtrer en gang til slik at vi mister så få celler som mulig. Sentrifuger røret med filtrerte celler 5 min ved 540g. Fjern supernatanten ved hjelp av vakuumsystem uten å komme borti pelleten. Vortex forsiktig og resuspender cellepelleten i 300 µL vaskebuffer.

Beinmargsbiospier («dry tap»)

Prepareres i Medimaskin. Se [AIT-17288 Medimaskin, behandling av biospier](#)

Ascites og andre biologiske væsker

Hele prøven sentrifugeres 5 min ved 540g. Fjern supernatanten ved hjelp av vakuumsystem uten å komme borti pelleten. Tilsett 4,5 mL vaskebuffer. Bland godt ved forsiktig vortexing. Fyll opp røret ved å tilsett nye 4,5 mL vaskebuffer. Bland godt ved forsiktig vortexing. Sentrifuger 5 min ved 540g. Fjern supernatant ved hjelp av vakuumsystem uten å komme borti cellepelleten. Fortsett med forvask om panelene krever det, eller resuspender cellepelleten i 300 µL vaskebuffer. Fortsett med EF Prosedyre 4 og/eller 5 for henholdsvis farging av overflate eller overflate/intracellulær markører.

Fikserte blod- og beinmargsprøver

Alle fikserte blod- og beinmargsprøver skal forvaskes minst en gang. Panelvalg avgjør om det kreves flere vasketrinn.

6.1 Prøvepreparering/forvask (EF PROSEDYRE 2)

Paneler som inkluderer farging av overflateimmunglobuliner krever **3 x forvask**.

Dette gjelder følgende paneler: LST, B-CLPD 1-4, BCP-ALL 1-4, 1K og PIDOT.

Prøver som er forvasket x 3 kan også benyttes til paneler som ikke inneholder overflateimmunglobuliner. Dersom det må settes opp flere panel på en prøve neste dag, kan en benytte vasket BM/blod fra dagen før.

1. Pipetter 300 µL godt blandet prøvemateriale over i 10 mL rør (1-2 stk.) som er merket med labnr/etikett. Klistre etikett på røret med «1 x vask» eller «3 x vask».
2. Tilsett 4,5 mL vaskebuffer.
3. Bland godt ved forsiktig vortexing.
4. Fyll opp røret ved å tilsett nye 4,5 mL vaskebuffer.
5. Bland godt ved forsiktig vortexing.
6. Sentrifuger 5 min ved 540g (Program 3).
7. Fjern supernatant ved hjelp av vakuumsystem uten å komme borti cellepelleten. **(Ikke dekanter, da mister du celler).**
8. Bland godt ved forsiktig vortexing.
9. Gjenta pkt 2-6 to ganger dersom man skal ha 3 x vask (totalt tre vasketrinn). Eller hopp direkte til punkt 10 når man kun skal ha 1 x vask.
10. Resuspender cellepelleten i 300 µL vaskebuffer.
I tilfeller der man vet at LPK er lav, vurder om det er nødvendig å tilsette vaskebuffer, vask evt flere glass om det skal settes opp mange paneler. Ved PIDOT-panelet tilsettes ikke vaskebuffer for å sikre at man får 200000 celler.
11. Fortsett med EF Prosedyre 4 og/eller 5 for henholdsvis farging av overflate eller overflate/intracellulær markører.

	Flowcytometrisk immunfenotyping av leukocytter - Euroflow metode	Prosedyre
Gyldig til: 23.10.2021	Versjon: 3.03	Dok-ID: AIT-57604

6.2 Merking av **kun** overflateantigener (EF PROSEDYRE 4)

OBS! PCD2 røret skal behandles identisk som PCD1 røret, beskrevet i *EF Prosedyre 5*, dersom begge PCD paneler skal settes opp (dette for å få samme styrke på CD138 PO signalet i begge rør).

1. Pipetter 50 µL med antistoffblanding i falconrør som er merket med etikett (labnr.) + panelnavn.

BCP-ALL MRD 1-2:

- Tilsett Euroflow vaskebuffer slik at man har totalt 100 µL antistoffblanding i røret.

T-ALL 2a, 2b og 3 paneler:

- Ta ut rør med frysetørret antistoff (BD Dried Stain 455) og merk dette med etikett (labnr. og panelnavn).
- Tilsett «drop-in» antistoffer (finn volum på arbeidsark).
- Tilsett Euroflow vaskebuffer slik at man har totalt 100 µL antistoffblanding i røret.

2. Tilsett 50 µL prøvemateriale i falconrør som er merket med etikett (labnr.) + panelnavn.
3. Bland godt ved forsiktig vortexing.
4. Inkuber 30 min mørkt i romtemperatur (RT).
5. Tilsett 2 mL FacsLyse (1:10).
6. Bland godt ved forsiktig vortexing.
7. Inkuber 10 min mørkt og i RT.
8. Sentrifuger 5 min ved 540g (Program 3).
9. Fjern supernatant ved hjelp av vakuumsystem uten å komme borti cellepelletten, slik at det er ca. 50 µL igjen i røret.
10. Vortex forsiktig.
11. Tilsett 2 mL vaskebuffer.
12. Bland godt ved forsiktig vortexing.
13. Sentrifuger 5 min ved 540g (Program 3).
14. Fjern supernatant ved hjelp av vakuumsystem uten å komme borti cellepelletten, slik at det er ca. 50 µL igjen i røret.
15. Vortex forsiktig.
16. Resuspender cellepelletten i 200 µL BD FACS Flow.
17. Samle inn cellene på flowcytometer med en gang, eller lagre mørkt og kjølig (4°C) i max 1 time.

6.3 Merking av overflate- og intracellulære antigener (EF PROSEDYRE 5)


OBS! Rør 4 i AML/MDS skal farges som beskrevet i *EF prosedyre 6*.

1. Pipetter 50 µL med antistoffblanding (mot overflateantigener) i falconrør som er merket med etikett (labnr. og panelnavn).

T-ALL 1, 4 og ETP paneler:

- Ta ut rør med frysetørret antistoff (BD Dried Stain 455) og merk dette med etikett (labnr. og panelnavn).
- Tilsett «drop-in» antistoffer (finn volum på arbeidsark).
- Tilsett Euroflow vaskebuffer slik at man har totalt 100 µL antistoffblanding i røret.

2. Tilsett 50 µL med prøvemateriale.

 HELSE BERGEN	Flowcytometrisk immunfenotyping av leukocytter - Euroflow metode	Prosedyre
Gyldig til: 23.10.2021	Versjon: 3.03	Dok-ID: AIT-57604

3. Bland godt ved forsiktig vortexing.
4. Inkuber 30 min mørkt i romtemperatur (RT).
5. Tilsett 2 mL vaskebuffer.
6. Bland godt ved forsiktig vortexing.
7. Sentrifuger 5 min ved 540g (Program 3).
8. Fjern supernatant ved hjelp av vakumsystem uten å komme borti cellepelletten, slik at det er ca. 50 µL igjen i røret.
9. Vortex pelletten forsiktig.
10. Tilsett 100 µL av reagens A i Fix&Perm-kit (fiksering). Bland godt ved vortexing i 1-2 sekunder.
11. Inkuber 15 min. i mørke og RT.
12. Tilsett 2 mL vaskebuffer.
13. Bland godt ved forsiktig vortexing.
14. Sentrifuger 5 min ved **300g** (Program 1).
15. Fjern supernatant ved hjelp av vakumsystem uten å komme borti cellepelletten, slik at det er ca. 50 µL igjen i røret.
16. Vortex kraftig, slik at cellepelletten blir helt resuspendert.
17. Tilsett 100 µL av Reagens B (permeabilisering).
18. Vortex forsiktig.
19. Tilsett antistoff mot intracellulære antigener (bruk volum anbefalt av EF).
20. Bland godt ved forsiktig vortexing.
21. Inkuber 15 min i mørke ved RT.
22. Tilsett 2 mL vaskebuffer.
23. Bland godt ved forsiktig vortexing.
24. Sentrifuger 5 min ved **300g** (Program 1).
25. Fjern supernatant ved hjelp av vakum system uten å komme borti cellepelletten, slik at det er ca. 50 µL igjen i røret.
26. Vortex forsiktig.
27. Resuspender cellepelletten i 200 µL BD FACS Flow.
28. Samle inn cellene på flowcytometer med en gang, eller lagre mørkt og kjølig (4°C) i max 1 time.

6.4 Nukleær (nu)TdT-merking (Kun til AML/MDS4). (EF PROSEDYRE 6)

1. Fortsett fra **EF prosedyre 4 - trinn 14** (trinnet for 200 µL FACS flow tilsettes).
2. Tilsett riktig mengde TdT antistoff (se EF anbefaling) i røret.
3. Vortex forsiktig.
4. Inkuber 15 min i mørke ved RT.
5. Tilsett 2 mL vaskebuffer.
6. Vortex forsiktig.
7. Sentrifuger 5 min ved 540g (Program 3).
8. Fjern supernatant ved hjelp av vakumsystem uten å komme borti cellepelletten, slik at det er ca. 50 µL igjen i røret.
9. Vortex forsiktig.
10. Resuspender cellepelletten i 200 µL BD FACS Flow.
11. Vortex forsiktig.
12. Samle inn cellene på flowcytometer med en gang, eller lagre mørkt og kjølig (4°C) i max 1 time.

 HELSE BERGEN	Flowcytometrisk immunfenotyping av leukocytter - Euroflow metode	Prosedyre
Gyldig til: 23.10.2021	Versjon: 3.03	Dok-ID: AIT-57604

Antistoff-panel	Rør	Euroflow SOP prosedyrer			
		2 Forvask	4 Overflate	5 Overflate +Intracellulær	6 Kjerne
ALOT	1			X	
LST	1	X	X		
SST	1		X		
B-CLPD	1-4	X	X		
T-CLPD	1,2,4,6 3,5		X		
AML/MDS	1-3,5-7 4		X		
PCD	1-2			X	
BCP-ALL	1,4 2,3	X X	X		
BCP-ALL MRD	1-2		X		
T-ALL	1,4,ETP 2a,2b,3		X	X	
NK-CLPD	1,2 3		X		
PIDOT		X	X		
1G			X		
1K		X	X		

(Vi har valgt å ikke utføre Euroflow SOP prosedyre 3 – hvor man først farger med backbone markører. Ved bruk av databaser fra Euroflow kan det bli aktuelt å innføre denne prosedyren)


7 Innkjøring på flowcytometer

Se egen prosedyre [AIT-57598 Innkjøring av prøver på FACSCanto II - med Euroflow SOP innstilling](#)

8 Kvalitetskontroller

- Flowcytometer innstillinger kontrolleres daglig med Rainbowbeads og «normalblod». Se [AIT-57482 Rainbowbeads- daglig kontroll av applikasjonssetting](#) og [AIT-57486 LWB - Daglig kontroll av FSC / SSC](#).
- The EuroFlow Lymphoid Screening Tube (LST)-QA program. 3 blodgivere settes opp 2 ganger i året på LST-panel, og filer sendes til Euroflow. Dette gir en monitorering av hele analyseprosessen.
- Vi deltar på UK Neqas sitt kvalitetsprogram for PNH-analyse og B-ALL MRD, Leucocyte Immunophenotyping (LI).

Se [AIT-18172 Eksterne kvalitetskontroller, seksjon for flowcytometri](#) for detaljer om Euroflow LST QA og Ukneqas kvalitetsprogram.

 HELSE BERGEN	Flowcytometrisk immunfenotyping av leukocytter - Euroflow metode	Prosedyre
Gyldig til: 23.10.2021	Versjon: 3.03	Dok-ID: AIT-57604

9 Resultater

Følg egen prosedyre [AIT-45070 Rekvirering/ besvarelse/ arkivering - utvidet immunfenotyping](#).

Dersom man mistenker blodtilblanding i beinmargsprøver kan følgende formel benyttes.

PB contamination index (cut-off=1.2):

$$PBCI = -3,052 + 0,065 * (\%CD10+G) - 0,609 * (\%CD34+) - 2,008 * (\%PC) = \text{_____} = \text{_____}$$

G = granulocytter (i 1G panelet)

PC = plasmaceller (CD38++ celler i LST-panelet)

10 Målesikkerhet

Se pkt. 12 Feilkilder.

11 Metodebegrensning

Når beinmargaspirat/blodprøver som er fiksert med «Streck cell preservative» settes opp med intracellulære paneler må resultatet tolkes med varsomhet.

Fiksering er mest egnet for å bevare lymfocytene.

Se også pkt. 12 Feilkilder.

12 Feilkilder

- Lang transporttid for prøven til laboratoriet
- Hemolyse
- Koagler i prøven
- Feil/manglende antistoff i antistoffpanel.
- Brukt feil eller manglende kompensering.
- Feilmerking av prøver (navn, fødselsnr og prøvemateriale)
- Se også [AIT-51018 Målesikkerhet, usikkerhetsbidrag \(feilkilder\) og variasjon ved analyser](#)

Vedlegg

Interne referanser

AIT-51018	Målesikkerhet, usikkerhetsbidrag (feilkilder) og variasjon ved analyser
AIT-63254	Egenproduserte løsninger/fortynninger AIT
AIT-59464	Dokumentasjonsskjema egenproduksjon/fortynning AIT
AIT-18172	Eksterne kvalitetskontroller, seksjon for flowcytometri
AIT-19714	Kvantitering av CD34 (Stamceller)
AIT-43405	Flowcytometrisk bestemmelse av HLA-B27 /B7 med tanke på krvsreaksjon
AIT-24279	Problemstilling - Strategi ved oppsett av immunfenotyping
AIT-29470	Preservering av hvite blodceller for senere analyse
AIT-24238	Tillaging av antistoffpaneler
AIT-21002	Bronchoalveolar lavage (BAL)
AIT-22430	Immunsvikt og COVID
AIT-17288	Medimaskin, forbehandling av biopsier
AIT-18312	Multiparameter Flowcytometri av Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH)
AIT-25671	Recent thymic emigrants (RTE)
AIT-45486	T-REG & AML-AXL
AIT-58013	Utredning av trombocytdefekter
AIT-57482	Rainbowbeads- daglig kontroll av applikasjonsetting

 HELSE BERGEN	Flowcytometrisk immunfenotyping av leukocytter - Euroflow metode	Prosedyre
Gyldig til: 23.10.2021	Versjon: 3.03	Dok-ID: AIT-57604

AIT-57486	LWB - Daglig kontroll av FSC / SSC
AIT-57598	Innkjøring av prøver på FACSCanto II - med Euroflow SOP innstilling
AIT-58306	Antistoff - hovedliste og arbeidsark
AIT-58856	Flowcytometrisk immunfenotyping - ALLTogether
AIT-45070	Rekvirering/ besvarelse/ arkivering - utvidet immunfenotyping.
AIT-59922	Arbeidsark til immunfenotyping- Screening
AIT-57594	Vaskebuffer til Euroflow SOP
AIT-28229	Bruk av Hettich sentrifuge Universal 320 og 320R
AIT-32002	Sentrifugeprogram for Hettich Universal 320 og 320R sentrifuge.
AIT-10070	FACSCanto flowcytometer
AIT-10211	Kjemikalieregister AIT

Eksterne referanser

Vedlegg 7: Prosedyre for forbehandling og merking fra laboratoriet i Oslo

 Oslo universitetssykehus	Prosedyre	Farging av overflate- og cytoplasmatiske antigener til flowcytometri	
	Klinikk for laboratoriemedisin (KLM)/Avd. patologi /Flowcytometri	Godkjent av: Staffan Eidhagen	Godkjent fra: 22.01.2021
Dokument-ID: 17117	Dokumentansvarlig: Ingunn Østlie		
Versjon: 20	Utarbeidet av: Ingunn Østlie		
Status: Godkjent			

1. Endringer siden forrige versjon

Januar 2021: Prøver med kuldeagglutiner skal forbehandles i varmeskap 37 grader. Tilføyd punkt ang. dokumentasjon.

Desember 2019: Rør med overflate kappa/lambda-farging på cytologiske prøver inkuberes i varmeskap ved 37 grader. Blod- og benmargsprøver med dårlig separasjon for overflate kappa/lambda kan også inkuberes i varmeskap.

September/oktober 2019: Spinalvæsker hemolyseres alltid. Vurder hvor lenge de skal hemolyseres ut fra synlig rød pellett. Spinalvæsker sentrifugeres ved 1200 rpm/290 g.

2. Hensikt og omfang

Prosedyre for tilsetning av antistoffer mot overflateantigener og intracellulære antigener på celler fra blod, benmarg og andre kroppsvæsker.

3. Ansvar

Arbeidspost 3

4. Fremgangsmåte

Utstyr

- Dispensette™ dispenser (volum 1 liter)
- Engangs pasteurpipetter, 3 ml
- Eppendorf multipipette plus
- Falconrør 5 ml
- Engangskorker som passer Falcon-rør
- Sikkerhetsbenk med vann/sug
- Pipetter: (2-20µl, 20-200µl, 100-1000µl)
- Pipettespisser: Rainin spisser med filter, størrelser som tilsvarer pipettene ovenfor
- Sentrifuge
- Polypropylenrør, 15 ml
- Stativer
- Vortex

Reagenser

- Filtrert FACS™ Lysing Solution (10x konsentrat, fortynnes med destillert vann)
- Invitrogen Fix and Perm (AB-medium)
- Vaskebuffer: Filtrert PBS med 0,2 % BSA + 2 mM EDTA
- Oppbevaringsvæske (RPMI m/ 10% FCS)
- Antistoffer og antistoffcocktails, se paneler og folder på arbeidsbenk for volum/test

[Se prosedyre](#) for tillaging av reagenser.

Prøvemateriale

- Antikoagulert fullblod
- Antikoagulert benmargspirat
- Finnålsaspirat (FNA)
- Spinalvæsker
- Andre kroppsvæsker/effusjoner
- Cellesuspensjon av biopsi, fersk eller optint

4.1 Immunfarging av blod, benmarg og andre celler i suspensjon for flowcytometri

Vær oppmerksom på at dokumentet kan være endret etter utskrift.			
Prosedyre Farging av overflate- og cytoplasmatiske antigener til flowcytometri			Utskriftsdato: 11.03.2021
Dokumentansvarlig: Ingunn Østlie	Godkjent av: Staffan Eidhagen	Dokument-Id: 17117 - Versjon: 20	Side 1 av 4

Prøvematerialet er mottatt og registrert ved Enhet for flowcytometri. CM/CG/BM-nummer kobles til et FM-nummer før farging, [se prosedyre](#). Rett antall Falconrør merkes med gule etiketter med FM-nummer og etiketter med antistoffkombinasjoner bestilt i panelark fra legen.

4.1.1 Forbehandling andre kroppsvæsker/cellesuspensjoner:

Finnålsaspirat (FNA)

1. Prøvematerialet fordeles direkte til merkede Falconrør. Juster celleantall pr/rør ut fra WBC-tall på tellelapp fra Sysmex XP-300. Spar alltid litt av materialet, oppbevares i boks i kjøleskap lab 3-H8-02.
2. Prøver med overflatefarging av Kappa/Lambda vaskes x3 med 2 ml vaskebuffer, andre antistoffkombinasjoner trenger bare 1 vask (sentrifuger 540g i 5 min, hell av supernatanten).

Effusjoner (ascites, pleuravæske mm.)

1. Ved stort volum av prøvematerialet overføres 2 ml av væsken til merkede Falconrør og sentrifugeres på 540g 5min. Hell av supernatanten. Materiale som blir til overs oppbevares i boks i kjøleskap lab 3-H8-02.
2. Prøver med overflatefarging av Kappa/Lambda vaskes x3 med 2 ml vaskebuffer, andre antistoffkombinasjoner trenger bare 1 vask (sentrifuger 540g i 5 min, hell av supernatanten).

Spinalvæske:

1. Spinalvæsker telles ikke. Hele pelletten overføres til merkede Falconrør og vaskes 1 gang med 2 ml vaskebuffer før farging (sentrifuger **OBS! 290g** i 5 min, hell av supernatanten). Rør merket Supernatant oppbevares i boks i kjøleskap lab 3-H8-02.
 - OBS! Spinalvæsker på Transfixmedium går ikke via Enhet for cytologi siden cellene er uegnet for morfologisk us. Overfør all væsken til merket 15 ml sentrifugerør, sentrifuger ved **OBS! 290g** i 5 min, overfør supernatanten til originalrør (merkes med "supernatant" og oppbevares i boks i kjøleskap lab 3-H8-02). Tilsett 2 ml vaskebuffer til pelletten, overfør til merket falconrør, sentrifuger ved **OBS! 290g** i 5 min, hell av supernatanten. Pelletten er klar for farging.

Cellesuspensjon av biopsi - fersk/nedfryst

1. Ferske celleduspensjoner fra biopsier fordeles til (om mulig) ca 1 million celler pr merket Falconrør.
2. Vask 1 gang med 2 ml vaskebuffer før farging (sentrifuger 540g i 5 min, hell av supernatanten).

-
1. Fryst celleduspensjon: NB! Biopsien tines umiddelbart før farging pga begrenset holdbarhet.
 2. Fryste celleduspensjoner fra biopsier står enten i -80 gradersfryser nr. 10 på Fryserom i 3. etasje OCC1 eller i nitrogentank i Forskningsbygg. Se "Fryseperm" for eksakt lokasjon. Stryk over aktuelt BM-nummer i permen når biopsien tas ut, noter bak hva den skal brukes til.
 3. Kryorør med celleduspensjon tines i 3 minutter i varmeskap.
 4. Merk et 15 ml sentrifugerør med FM-nummer og fyll opp med 10 ml "Oppbevaringsvæske". Den tinte celleduspensjonen overføres raskt til 15 ml røret og sentrifugeres ved 540 g i 5 min.
 5. Hell av supernatant og resuspender pellett i vaskebuffer. Fordel prøvemateriale til merkede Falconrør, ca 1 million celler pr rør (husk at ca halvparten av cellene dør i fryse/tine-prosessen).
 6. Falconrørene vaskes 1 gang med 2 ml vaskebuffer før farging (sentrifuger 540g i 5 min, hell av supernatanten).
 7. Prøvemateriale som blir til overs plasseres i stativ sammen med ferdigfargete blod- og benmargsprøver.

4.1.2 Forbehandling blod/benmarg:

1. Blod/benmarg er overført (2-3ml) til 15 ml polypropylenrør og står i sikkerhetsbenk for prøvemottak på lab 3-H8-01, ev. i kjøleskap.
2. Fyll rørene med vaskebuffer og bland godt.
3. Sentrifuger 540g i 5 min.
4. Sug av supernatant med vannsug. OBS! Pipettespissen på vannsug skal byttes daglig. Bruk spisser uten filter og skriv på dato.
5. Gjenta pkt 2-4, resuspender celler til det opprinnelige volumet. OBS! Ved svært celledattig eller cellerik prøve kan konsentrasjonen reguleres ved å suge av mer eller mindre supernatant.
 - **Unntak! Prøver med kjent CAD/kuldeagglutinin varmes opp i varmeskap 37 grader sammen med vaskebuffer før vask.**

OBS: Fargeprosedyren for overflate- og intracellulære antigener er den samme for alle prøvematerialer. Inkuberingstid med

Vær oppmerksom på at dokumentet kan være endret etter utskrift.		
Prosedyre Farging av overflate- og cytoplasmatiske antigener til flowcytometri		Utskriftsdato: 11.03.2021
Dokumentansvarlig: Ingunn Østlie	Godkjent av: Staffan Eidhagen	Dokument-id: 17117 - Versjon: 20
		Side 2 av 4

FacLyse kan nedjusteres til 3-5 min dersom det ikke er synlig rød pellett (f.eks. for spinalvæsker).

- **Unntak! Spinalvæsker sentrifugeres ved 290g.**
- **Unntak! Cytologiske væsker (spinalvæsker, FNA, effusjoner) med overflate kappa/lambda-farging inkuberes i varmeskap ved 37 grader. Blod-/benmargsprøver med dårlig separasjon av overflate kappa/lambda kan også inkuberes i varmeskap.**

4.2 Overflatefarging

1. Fordel prøvemateriale justert ut fra WBC-tall på tellelapp fra Sysmex XP-300 i de respektive Falconrørene. Beregn ca 1 million celler pr Falconrør om mulig (OBS! Cellefattige prøver max 150 µl, svært cellerike prøver 10/20 µl + juster med PBS til totalt 50 µl).
2. Vask alle rør med overflatefarging av Kappa og Lambda med 2 ml vaskebuffer og sentrifuger 540g i 5 min (etiketter er merket med "3x vask"). Hell av supernatanten ev. bruk engangspipette.
3. Tilsett 50 µl antistoffcocktail i hvert rør eller tilsett antistoff manuelt. For enkelte kombinasjoner kan Backbonecocktail (B,- T- eller AML-MDS) benyttes sammen med manuelt tilsatte antistoffer, se panel. Volum (µl) står på panel eller på oversikt på benk ved vindu. Bland godt og inkuber mørkt i 15-30 min.
4. Tilsett 2 ml Facs Lysing Solution i hvert rør. Bland og sett mørkt i 10 min. Bland på vortexmikser en gang til etter inkubering for å forsikre at erytrocyttene hemolyseres godt.
5. Sentrifuger 540g i 5 min og hell av supernatanten. Trykk rørene mot celledstoff for å fjerne mest mulig væske. Leukocyttene sitter fast i bunnen av røret.
6. Vask med 2 ml vaskebuffer i hvert rør, bland godt med vortexmikser. Sentrifuger 540g i 5 min og supernatanten helles av.
7. Tilsett 300 µl bærevæske (PBS).
8. Rørene ordnes i riktig rekkefølge iht panelark og settes i lystett boks i kjøleskap inntil kjøring. Prøvene bør kjøres innen 1 time etter farging.

4.3 Cytoplasmatisk farging

Cytoplasmatiske/intracellulære antigener farges etter overflateantigener. Etikettene er merket med gult. Utfør overflatefarging t.o.m. pkt.3.

4. Vask med 2 ml vaskebuffer i hvert rør. Sentrifuger 540g i 5 min og supernatanten helles av, evt suges av med engangspipette.
5. Tilsett 100µl Fix & Perm medium A i hvert rør og inkuber mørkt i 15 min.
6. Vask med 2 ml vaskebuffer i hvert rør. Sentrifuger 540g i 5 min og supernatanten helles av.
7. Tilsett 100µl Fix & Perm medium B i hvert rør og bland godt. Tilsett antistoff iht panel-ark og inkuber mørkt i 15 min.
OBS! Se unntak punkt 4.4!
8. Vask med 2 ml vaskebuffer i hvert rør. Sentrifuger 540g i 5 min og supernatanten helles av.
9. Gjenta punkt 8. Tilsett 300 µl bærevæske (PBS).

4.4 Unntak der fargeprosedyren skiller seg ut

nuTdt FITC, CD235a/GlyA PE og kombinasjonen "**cyIgM-cyMPO-cy79a-CD19-cyCD22-CD45**" i panel 6 B-ALL Nopho

Farging med nuTdt FITC:

Tdt FITC tilsettes etter hemolysering med Facs Lysing Solution. Etikettene er merket med grønt. Utfør overflatefarging (punkt 4.2) t.o.m. pkt.6.

- Tilsett Tdt FITC og inkuber mørkt i 15 min.
- Vask med 2 ml vaskebuffer. Sentrifuger 540g i 5 min og supernatanten helles av.
- Tilsett 300 µl bærevæske (PBS).

Farging med Glycophorin A (CD235a):

CD235a tilsettes etter hemolysering med Facs Lysing Solution. Utfør overflatefarging t.o.m. pkt.6.

- Tilsett CD235a og inkuber mørkt i 15 min.
- Vask med 2 ml vaskebuffer. Sentrifuger 540g i 5 min og supernatanten helles av.
- Tilsett 300 µl bærevæske (PBS).

Vær oppmerksom på at dokumentet kan være endret etter utskrift.

Prosedyre Farging av overflate- og cytoplasmatiske antigener til flowcytometri	Utskriftsdato: 11.03.2021
Dokumentansvarlig: Ingunn Østlie	Godkjent av: Staffan Eidhagen
	Dokument-Id: 17117 - Versjon: 20
	Side 3 av 4

Farging av kombinasjon cyIgM-cyMPO-cy79a-CD19-cyCD22-CD45 (pga cyCD22 APC trenger lenger tid på å binde seg):

Utfør cytoplasmatisk farging t.o.m pkt.6

- Tilsett 100 µl Fix & Perm medium B, inkuber mørkt i 15 min.
- Vask med 2 ml vaskebuffer i hvert rør. Sentrifuger 540g i 5 min og supernatanten helles av.
- Tilsett cytoplasmatiske antistoffer og inkuber mørkt i 30 min. Sentrifuger 540g i 5 min og supernatanten helles av.
- Tilsett 300 µl bærevæske (PBS).

4.5 Dokumentasjon

- Signer med initialer og dato på panelskjema under "Farging".
- Skriv opp lotnummer på cocktailer som er brukt på panelskjema. Noter ned "ny" bak cocktailer som tas i bruk (holder å skrive ned på første prøve den brukes på). Skriv opp på tavle når siste cocktail tas i bruk.
- Legg inn utførte analyser på baksiden i DocuLive patologi (F11), og signer ut. Signer med initialer og dato på panelskjema under "Signert ut Doculive".

5. Referanser

Teori og prinsipp

Flowcytometrisk immunfenotyping er en analyse av enkeltceller i suspensjon som viser uttrykk eller fravær av ulike antigener. Cellene merkes med fluorescensmerkede antistoffer mot spesifikke antigener på cellenes overflate eller i cytoplasma. Monoklonale antistoffer mot samme antigen grupperes og får et identisk "Cluster of Differentiation" nummer (CD-nummer).

Analyse av cellenes antigener kalles immunfenotyping og er et viktig verktøy ved diagnose og klassifisering av blodsykdommer. Cellene kan inndeles i ulike cellelinjer, differensierings- og modningsstadier, samt til detektering og karakterisering av maligne celler, disse har som oftest en avvikende immunfenotype fra normale celler.

Ved immunfarging benyttes en kombinasjon av antistoffer konjugert til ulike fluorokromer. Antistoffene kan tilsettes én etter én i fast rekkefølge, eller samtidig som en cocktail. Coctailen lages manuelt og er holdbar i kjøleskap i 4 uker. Mengden antistoff som benyttes er vurdert utfra titrering, Euroflows anbefaling og egne erfaringer. Antistoffpanel som velges er avhengig av kliniske opplysninger og cellenes morfologi i utstryk.

Vi bruker metoden "Stain, lyse and wash". Antistoffene blir tilsatt direkte til prøvematerialet, deretter lyses de røde blodlegemene og cellene blir vasket for å fjerne rester av ødelagte celler og ubundne antistoffer. Antistoff-inkuberingen skjer mørkt og med tidsbegrenset inkuberingstid (fra 15-30 minutter) for å unngå at fluorokromene blir ødelagt og at antistoff-antigen komplekset blir endocyttert.

Ved immunfarging av intracytoplasmatiske og overflate-antigener samtidig tilsettes først antistoffer mot overflateantigener, etterfulgt av fiksering og permeabilisering før antistoffer mot intracytoplasmatiske antigener blir tilsatt. Inkuberingstid og fikserings- og permeabiliseringsløsning varierer og er avhengig av målantigenet. For de fleste intracytoplasmatiske antistoff blir permeabiliseringsvæske og antistoff tilsatt samtidig, men det er unntak. cyCD22 trenger lengre inkuberingstid for å oppnå optimal antigen-antistoff binding og tilsettes derfor etter permeabiliseringsvæsken er vasket bort.

Glycophorin a (CD235a), som er en markør for den erythroide cellelinjen og uttrykkes fra sent erythroblaststadium til modne røde blodlegemer, tilsettes etter hemolysering for å kunne påvise erythroide forstadier som er resistente mot hemolyse. nuTdt tilsettes også etter hemolysering. Her fungerer hemolysering som fiksering og permeabilisering og åpner opp cellemembranen tilstrekkelig til at antistoffene kan komme inn i cytoplasma.

Andre eHåndboksdokumenter

- [Prøvemottak ved Enhet for Flowcytometri](#)
- [Registrering av prøver til flowcytometri i DocuLive patologi](#)
- [Tillaging av reagenser ved enhet for flowcytometri, OUS Radiumhospitalet](#)

Vær oppmerksom på at dokumentet kan være endret etter utskrift.

Prosedyre Farging av overflate- og cytoplasmatiske antigener til flowcytometri	Utskriftsdato: 11.03.2021
Dokumentansvarlig: Ingunn Østlie	Godkjent av: Staffan Eidhagen
Dokument-Id: 17117 - Versjon: 20	Side 4 av 4

Vedlegg 8: Panel med rør som benyttes ved mistanke om KLL ved laboratoriet i Oslo

02. B-cellelymfom + Oppfølging + PCD

FM-nr:

Prøvemateriale: ingen Evt. volum 0 µl CITO Utfyllt av: ingen

	Rør	Bakside Doculive	PB (452 nm)	KO (528 nm)	Fitc (520 nm)	Pe (578 nm)	PercPCy5.5 (676 nm)	PeCy7 (785 nm)	APC (660 nm)	APCH7/AP750 (785 nm)	Dato cocktail
<input type="checkbox"/>	1	01	Granulopatriese	HLA-DR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD10	
<input type="checkbox"/>	2	02	LST (3x vask)	CD20+CD4	CD45	CD8+lambd	CD56+kappa	CD5	CD19+ TCRγδ	CD3	
<input type="checkbox"/>	3	03	KLL	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43 AF750
<input type="checkbox"/>	4	04	FL/DLBCL	CD20 1µl	CD45 5µl	cyBc2 10µl	CD44 5µl	CD34 10µl	CD19 5µl	CD10 5µl	CD38 5µl
<input type="checkbox"/>	5	05	BL (Burkitt)	CD20	CD45	CD38 5µl	CD44 5µl	-	CD19	IgM 20µl	CD10 5µl
<input type="checkbox"/>	6	06	LPL/PCD	CD20	CD45	cyLambda1 25µl	CD138 10µl	CD19 10µl	CD56 5µl	cyKappa 2 5µl	CD38 2,5µl
<input type="checkbox"/>	7	07	HCL	CD20	CD45	CD103 10µl	CD25 10µl	CD11c 10µl	CD19	CD123 5µl	CD10 5µl
<input type="checkbox"/>	8	08	KLL/MCL MRD (3xvask)	CD20	CD45	Lambda 5µl	Kappa 5µl	CD5 10µl	CD19	CD200 5µl	CD43 AF750 5µl
<input type="checkbox"/>	9	09	HCL MRD (3xvask)	CD20	CD45	CD103 10µl	CD25 10µl	CD11c 10µl	CD19	Kappa 2,5µl	Lambda 5µl (OBS! Monokl)
<input type="checkbox"/>	10	10	FL/DLBCL MRD (3xvask)	CD20	CD45	cyBc2 10µl	Kappa 5µl	-	CD19	CD10 5µl	Lambda 5µl (OBS! Monokl)
<input type="checkbox"/>	11	11	BL MRD (3xvask)	CD20	CD45	Lambda 5µl	CD44 5µl	-	CD19	IgM 20µl	CD10 5µl
<input type="checkbox"/>	12	12	KLL prognose	CD3 5µl BD		CD5 10µl BD			CD19 5µl		
<input type="checkbox"/>	13	13	"	CD3		CD5			CD19	CD38 2,5µl BD	
<input type="checkbox"/>	14	60	MZL (3xvask)	CD20	CD45	Lambda 5µl	CD180 10µl	CD5 10µl	CD19	Kappa 2,5µl	CD10 5µl

Kjøring:

Rør 1: Kjør 150 000 totale events
 Rør 2: Kjør 100 000 totale events
 Rør 3-11: Kjør 10 000 totale B-celler eller tomt (OBS! Rør 6 LPL/PCD: Kjøres 1 000 000 events eller tomt)
 Rør 12-13: Kjør 50 000 totale events

Farging: Grå farge = backbone CD20-CD45-CD19

Monoklonale B-celler:

Kommentar:

Prøvekvalitet: Klumpete/hemolysert/slimete materiale, cellerik/cellefattig ved kjøring

Farget av (dato/initialer): _____ Kjørt på FACSLyric: Kjørt på Gallios: Analysert av (dato/initialer): _____
 Signert ut Doculive: _____ Worklist/loader, karusell (dato/initialer): _____
 Kontrollert/overført (dato/initialer): _____

Prøven skal leveres til MOLPAT: Ja Nei Prøven er levert av (dato/initialer): _____
 IgH mutasjonsanalyse (pasienter =/ < 75 år): OBS! v/KLL:

Vedlegg 9: Prosedyre for forbehandling og merking fra laboratoriet i Tromsø



Immunfenotyping - Preparering og screening av PB og BM

Dokumentansvarlig: Goran Kauric
Godkjent av: Harald Strand
Gyldig for: Laboratoriemedisin Tromsø UNN

Dokumentnummer: PR47379
Versjon: 4

Papirkopi i lindcomat på Flowcytometri lab

Hensikt

Flowcytometrisk deteksjon av immunfenotype til celler i PB og BM for å kunne påvise eventuelle patologiske cellepopulasjoner og gjøre en utvidet fenotyping av cellene. Immunfenotyping av WBC benyttes hovedsakelig for å identifisere og karakterisere maligne celler ved leukemier og lymfomer. Ved denne teknikken påviser man antigener som befinner seg enten på overflaten av cellene og/eller intracellulært. Disse antigenene benevnes CD-markører (Cluster of differentiation). Ved immunfenotyping brukes kombinasjoner av monoklonale antistoff med spesifitet for de enkelte CD-markører. Binding av antistoff påvises ved flowcytometri

Omfang

APPARATUR

FACSCanto II flowcytometer, for bruk se egne prosedyrer.
Hettich Zentrifugen Rotina 46

ANALYSEMATERIALE

Perifert blod og beinmarg. For prøvetakning se i laboratoriehåndbok «Immunfenotyping» <https://labhandbok.unn.no/immunologi-og-blodbank/immunfenotyping-article1830-864.html>.

Prøven bør analyseres innen 24 timer etter at den er tatt. Dette kan utvides til 72 timer ved behov og etter vurdering av fagansvarlig lege/spesialbioingeniør.

REAGENSER OG LØSNINGER

Antistoffer fra diverse leverandører.
FACS Lysing Solution (stamløsning fortynnet 1:10 i dH₂O)
FacsFlow
CellFix bruksløsning (stamløsning fortynnet 1:10 i dH₂O)

PANEL

For panel til screening, se *SJ4565 Arbeidsskjema-Screening i PB og BM*
Mengde av antistoff varierer fra leverandør til leverandør og fra konjugat til konjugat, disse er oppgitt på skjemaet. Vi bruker forhåndslaget cocktails som etter erfaring kan brukes i opp til 1 mnd etter at de er laget.

Dette er kun en papirkopi. Gyldig versjon av dokumentet finnes i det elektroniske kvalitets systemet.

Side 1 av 3

Arbeidsbeskrivelse

1. Filtrer beinmargen ved hjelp av Filcons filter (30 eller 50 μm).
2. Tell WBC på Sysmex.
3. Prøvevolum per rør bestemmes på følgende måte:
 - Ved WBC 5-50 brukes 100 μl av PB/BM.
 - Ved WBC < 5 brukes 200 μl av PB/BM.
 - Ved WBC > 50 brukes 50 μl av PB/BM.**NB!** Det må være nok prøvematerialet til både screening og evt. identifisering
4. Begynn først med å vaske celler for rør nr. 1. Pasientens plasma som alltid inneholder immunglobuliner må fjernes slik at våre antistoffer mot kappa og lambda Ig-lettekjeder ikke blir blokkert av Ig fra pasientens sirkulasjon.
5. Ha 50-200 μl PB eller BM i et falconrør merket med nr. 1 og prøvenummeret (etikett kan brukes), tilsett 2-3 ml FACSFlow bland på Vortex og sentrifuger ved 1700 rpm i 3 minutt. Sug av supernatanten med Pasteur pipette og gjenta vaskeprosedyren an gang til. Sug av supernatanten med Pasteur pipette til slutt.
6. Tilsett nå 50-200 μl PB og BM i respektive falconrør for resten av screenings panelet dvs i de rørene hvor det ikke er nødvendig å vaske cellene på forhånd.
7. Tilsett antistoffblandinger i respektive rør, bland på vortexmikser (NB! Ikke glem å blande) og inkuber mørkt i 15 minutter ved RT.
8. Tilsett FACSLysing Solution (bruksløsning), sett på kork og bland på vortexmikser. Inkuber i 10 min mørkt og i romtemperatur.
 - Ved 100 μl prøvemateriale brukes 2 ml FACSLysing Solution.
 - Ved 50 μl prøvemateriale brukes 1 ml FACSLysing Solution.
 - Ved 200 μl prøvemateriale brukes 3-4 ml FACSLysing Solution.
9. Sentrifuger ved 1710 rpm i 3 minutt, tøm av supernatanten i avtrekkskapet. Tilsett 2-3 ml FACSFlow, bland på vortex, sentrifuger en gang til ved 1710 rpm i 3 min og tøm supernatanten i avtrekkskapet.
10. Tilsett 700 μl FACSFlow til falconrørene.
11. Preparerte prøver analyseres på flowcytometeret helst med en gang, hvis dette ikke er mulig bør de analyseres innen 1-2 h. I mellomtiden må de oppbevares i kjøleskapet forsegle med kork eller parafilm.

12. Etter at data er samlet inn på flowcytometret må disse analyseres og resultater i pdf format «leveres» enten til ansvarlig/vakthavende lege eller fagområdet ansvarlig bioingeniør for vurdering. Dette for å få vite om det skal utføres en utvidet immunfenotyping ved hjelp av et KLL-, AML-, ALL- eller TLL-panel, se også prosedyren [PR33309 Immunfenotyping- Veiledende sjekklister etter screening](#).

Feilkilder

Det vanligste er feilpipettering/forveksling av monoklonale antistoffer og/eller forbytting av prøver. Den som utfører prosedyren må hele tiden være fokusert og ha gode rutiner for kontroll av ID til pasienten/prøven og nødvendige antistoffer.

Kvalitetskontroller

Vi er påmeldt til NEQAS Leucocyte Immunophenotyping programme (Leukemia Immunophenotyping Part 1 og 2) og får tilsendt kvalitetskontroller 4 ganger per år.

Vedlegg 10: Prosedyre for forbehandling og merking ved utvidet analyse fra laboratoriet i Tromsø



Immunfenotyping - Utvidet analysering av prøver etter utført screening

Dokumentansvarlig: Goran Kauric
Godkjent av: Harald Strand
Gyldig for: Laboratoriemedisin Tromsø UNN

Dokumentnummer: PR34504
Versjon: 3

Papirkopi i lindcomat på Flowcytometri lab

1. Hensikt

Flowcytometrisk deteksjon av immunfenotype til celler i PB og BM for å gi full identifisering av patologiske cellepopulasjoner etter screening.

Identifisering gjøres både på nye pasienter der screening har vist patologiske cellepopulasjoner eller hos pasienter der det tidligere er påvist patologiske cellepopulasjoner. Hos pasienter der tidligere er påvist patologiske cellepopulasjoner vil screening ofte være unødvendig.

2. Grunnlagsinformasjon

ANALYSEPRINSIPP

Flowcytometri.

ANALYSEMATERIALE

Perifert blod og beinmarg. For prøvetakning, prøvebehandling og forsendelse se Immunfenotyping i Laboratoriehåndbok (<https://labhandbok.unn.no/immunologi-og-blodbank/immunfenotyping-article1830-864.html>).

- Prøven bør analyseres innen 24 timer etter at den er tatt. Dette kan utvides til 72 timer og hvis ønskelig kan viabilitet testes med 7AAD eller DRAQ-5.

REAGENSER OG LØSNINGER

Monoklonale antistoffer fra diverse leverandører (BD, Dako, BeckmanCoulter, Milteny, Cytognos osv.)

FACSLysing Solution (stammløsning fortynt 1:10 i diH₂O)

FACSFlow

NH₄Cl (stamløsning fortynt 1:10 i diH₂O)

CellFix (stamløsning fortynt 1:10 i diH₂O)

APPARATUR

FACSCanto II for bruk se egne prosedyrer.

Hettich Zentrifugen Rotina 46

Vortex mikser

3. Forberedelse for innmerkning med antistoffer

For kombinasjon av antistoffer se arbeidsskjema med de respektive panelene.
Se mengder av antistoff på selve skjemaet.

- 1 Hvis screening er utført på det mottatte prøvematerialet, utføres ikke punkt 2. og 3.
Hvis det ikke utføres screening på prøvematerialet først, utføres punkt 2. og 3. først.
- 2 Filtrer beinmargen ved hjelp av Filcons filter 30-50 µm.
- 3 Tell WBC på prøvematerialet på Sysmex.
- 4 Denne prosedyren gjelder preparering med Surface membran (Sm) dvs. overflatemarkører, for Immunfenotyping-Påvisning av intracellulære antigener (Ic / cy) se PR37175.
- 5 Merk falconrør fra 1 og oppover, skriv prøvenr. eller lim etikett utskrevet fra DIPS på rør nr. 1 og merk det også med PB eller BM.

4. Innmerkning med antistoffer på overflaten av cellene (Sm)

1. Pipetter antistoffene i falconrør foruten rør med antistoff mot Ig (Kappa/Lambda/IgM) i panelene.
 - a. Rør med antistoff mot Ig (Kappa/Lambda/IgM), se punkt 7.
 - b. For Ic utføres først innmerkning med antistoff for Sm markørene, men disse rør skal ikke lyses hverken med FACSLysing sol eller NH4Cl da permaabiliseringsløsning fungerer også som lyseringsbuffer.
2. Tilsett 100 µl PB og BM i sine respektive falconrør, bland på vortexmikser og inkuber i 15 min (beskytt mot lyset og ved romtemperatur).
 - a. Ved WBC > 50 brukes 50 µl av PB/BM.
 - b. Ved WBC < 5 brukes 200 µl av PB/BM. Det må være nok prøvematerialet til dette.
3. Tilsett 2 ml FACSLysing Solution (bruksløsning), sett kork på rørene, bland på vortexmikser og inkuber i 10 min mørkt og i romtemperatur.
 - a. Ved 50 µl prøvemateriale brukes 1 ml FACSLysing Solution.
 - b. Ved 200 µl prøvemateriale brukes 4 ml FACSLysing Solution.
4. Sentrifuger ved 1710 rpm i 3 minutt, tøm av supernatanten i avtrekkskapet.
5. Tilsett 2-3 ml FACSFlow, sett på korkene, bland på vortex, sentrifuger ved 1710 rpm i 3 min, kast korkene og tøm supernatanten i avtrekkskapet.
6. Tilsett 500 µl FACSFlow, sett på korkene og sett rørene i kjøleskap inntil de skal analyseres på flowcytometeret.

7. **For rør merket med antistoff mot Ig ((Kappa/Lambda/IgM) i panelene.**
8. Lag NH₄Cl bruksløsning (stamløsning fortynnes 1:10 i dH₂O).
9. Ha 100 µl PB eller BM i et falconrør og tilsett 2 ml NH₄Cl bruksløsning. Sett på korkene og bland på Vortex. Inkuber i 6 minutt ved RT. Tiden må ikke overskrides.
10. Samme prøvemengde som under pkt. 5 ved lavt eller høyt WBC.
11. Sentrifuger ved 1700 rpm i 3 minutt, kast korkene og tøm av supernatanten i avtrekk.
12. Vask x1 med 2-3 ml FACSFlow. Sett på korkene og bland på vortexen, sentrifuger i 1700 rpm i 3 minutt, kast korkene og tøm av supernatanten i avtrekk.
13. Tilsett antistoffene, sett på korkene bland på Vortexen og inkuber mørkt i 15 minutter ved RT.
14. Vask x1 med 2-3 ml FACSFlow. Sett på korkene og bland på vortexen, sentrifuger i 1700 rpm i 3 minutt, kast korkene og tøm av supernatanten i avtrekk.
15. Tilsett enten 500 µl FACSFlow eller CellFix (bruksløsning) til falconrørene, sett på korkene, bland på vortexen. Prøvene oppbevares i kjøleskapet til de skal kjøres på flowcytometeret.

5. Feilkilder

- Pipettering av feil kombinasjon av antistoff i respektive rør kan gi både falskpositive og falsknegative resultater.
- Utilstrekkelig/avglemt blanding av celledensjon og monoklonale antistoffer etter pipettering, kan gi «ujevn» binding av antistoff og antigen og «rare» resultater.
- Forbyting av prøver i forhold til hvilket panel med antistoff skal kjøres. Det kan bli for lite prøvemateriale for å repetere analysen.

Vedlegg 11: Screeningpanel som benyttes ved laboratoriet i Tromsø, og ekstra rør som kan tilføyes

Papirkopi på Flowcytometri lab

Screening 8-color

	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7/ AF 750	Horizon V450	Horizon V500
1	Kappa/Lambda 7,5 µl		CD5 15 µl	CD19 5 µl	CD10 2,5 µl	CD34 AF 750 5 µl	CD20 2,5 µl	CD45 3,5 µl
2	CD5 10 µl	CD7 5 µl	CD8 10 µl	CD2 2,5 µl	CD56 2,5 µl	CD4 AF 750 5 µl	CD3 2,5 µl	CD45 3,5 µl
3	CD13 5 µl	CD11b 5 µl	CD34 10 µl	CD16 1 µl	CD33 2,5 µl	CD14 -H7 5 µl	HLA DR 2,5 µl	CD45 3,5 µl

Dette er kun en papirkopi. Gyldig versjon av dokumentet finnes i det elektroniske kvalitetssystemet.

Side 1 av 2

Arbeidsskjema - Screening i PB og BM

Version: 4


Ekstra rør

	FITC	PE	PerCP (Cy5.5)	PE Cy7	APC	APC-H7 (AF 750)	Horizon V450	Horizon V500
PC 1	CD38 10 µl	CD56 (Cytognos) 5 µl	CD45 5 µl	CD19 5 µl	CD117 5 µl	CD81 -C750 3 µl	CD138 5 µl	CD27 5 µl
PC 2 (Ved behov og når PC1 gir positive funn)	Intracellulært vc38 (FITC)/ Lambda(PE)/Kappa (APC) 20 µl		CD45 5 µl	CD56 2,5 µl	*	CD19 AF 750 5 µl	CD138 5 µl	CD27 5 µl
HCL	CD103 5 µl	CD123 10 µl	CD5 15 µl	CD25 2,5 µl	CD11c 2,5 µl	CD14 -H7 5 µl	CD20 2,5 µl	CD45 3,5 µl
Mastceller Det skal samles inn minst 500.000 kjerneholdige/WBC	CD25 10 µl	CD2 5 µl	CD34 10 µl	CD117 5 µl	CD33 2,5 µl	CD38 AF 750 5 µl	HLA DR 5 µl	CD45 3,5 µl

Dette er kun en papirkopi. Gyldig versjon av dokumentet finnes i det elektroniske kvalitetssystemet.

Side 2 av 2

Vedlegg 12: Panel med rør som benyttes ved mistanke om KLL fra laboratoriet i Tromsø

HELSE  NORD

Arbeidsskjema - B-KLL/NHL

Dokumentansvarlig: Goran Kauric
Godkjert av: Renate Fjellidal
Gyldig for: Laboratoriemedisin UNN Tromsø

Dokumentnummer: SJ7707
Versjon: 1

	FITC	PE	PerCP/ Cy-5.5	PE- Cy7	APC	APC- H7 / A- 750	Horizon V-450	Horizon V-500
1*	CD56	CD30	CD5	CD19	CD15	CD3	CD20	CD45
2*	CD103	CD123	CD5	CD25	CD11c	CD14	CD20	CD45
3	CD79b	CD52	CD5	CD19	CD200	CD38	CD20	CD45
4	FMC7	CD23	CD5	CD19	CD3	CD43	CD20	CD45
5**	a-IgM	CD22	CD5	CD19	HLA DR	CD34	CD20	CD45
6**	κ	λ	CD5	CD19	CD10	CD14	CD20	CD45

* Dette røret trenger man ikke å kjøre ved oppfølging av vanlig B-KLL. Rør 2 trenger man ikke å kjøre hvis det er påvist en annen sykdom en HCL. Ved HCL er det nok å følge opp med rør 2 og 6.

** Disse rørene må lyseres enten med **NH₄Cl** eller må vaskes 2 ganger m/FACSFlo^w **for** merking med MoAb

NB! VED UKLAR/NEG REAKSJON MED CD5/CD10 SETT OPP ET EXTRA RØR MED CD10 FITC/CD5 PE/ CD19 APC/CD20 V-450/ CD45 V-500 !

Dette er kun en papirkopi. Gyldig versjon av dokumentet finnes i det elektroniske kvalitetssystemet.

Side 1 av 2

Arbeidsskjema - B-KLL/NHL
Versjon: 1

B-KLL INTRACELLULÆRT

	FITC	PE	PerCP/ Cy-5.5	PE- Cy7	APC	APC-H7 / A-750	Horizon V-450	Horizon V-500
1	IgG1	IgG2a	CD5	CD19	cy-CD3	Sm-CD3	CD20	CD45
2	cy-κ/ cy-λ		CD5	CD19	cy-CD22		CD20	CD45
3	cy-κ		CD5	CD19			CD20	CD45
4	cy-λ		CD5	CD19			CD20	CD45
5	cy-IgM		CD5	CD19			CD20	CD45

*Overflatefarging

Dette er kun en papirkopi. Gyldig versjon av dokumentet finnes i det elektroniske kvalitetssystemet.

Side 2 av 2

Vedlegg 13: E-poster sendt til, og mottatt fra kontaktpersoner ved laboratoriene i Oslo, Bergen og Tromsø

E-poster sendt til kontaktpersoner i Oslo, Bergen og Tromsø

Første e-post sendt til alle:

Hei!

Vi har fått tilsendt kontaktinformasjonen din fra spesialbioingeniør ved enhet for cytologi ved St. Olavs Hospital Gunnhild Vatne Leirvik. Vi er to studenter med et bachelorprosjekt der vi ønsker å kartlegge immunfenotyping av pasienter med kronisk lymfatisk leukemi. I den forbindelse ønsker vi blant annet å sammenligne St. Olavs Hospital sine protokoller med protokollene som brukes på andre sykehus i landet.

Derfor lurer vi på om dere har mulighet for å sende oss prosedyren som brukes ved immunfenotyping av pasienter med KLL på deres laboratorium. I tillegg til dette ønsker vi tilgang på panelene som benyttes til det samme formålet.

Takknemlig for all hjelp vi kan få fra dere!

Vennlig hilsen
Sunniva Asprem og Mari Hamre Bu
Bioingeniørstudenter
NTNU Trondheim

Andre e-post sendt til kontaktpersoner i Bergen og Tromsø:

Hei!

Tusen takk igjen for tidligere hjelp i forbindelse ved vårt bachelorprosjekt. Vi har et par nye spørsmål som vi håper dere har mulighet til å besvare.

- Hvilket flowcytometer benytter dere ved immunfenotyping?
- Benytter dere EuroFlow SOP for set-up og kompensasjon ved innstilling av flowcytometeret?

Vennlig hilsen
Sunniva Asprem og Mari Hamre Bu
Bioingeniørstudenter
NTNU Trondheim

Andre e-post sendt til kontaktperson i Oslo:

Hei!

Tusen takk igjen for tidligere hjelp i forbindelse ved vårt bachelorprosjekt.
Vi har noen nye spørsmål vi håper at dere har mulighet til å besvare.

- Hvilket flowcytometer benytter dere ved immunfenotyping?
- Benytter dere EuroFlow SOP for set-up og kompensasjon ved innstilling av flowcytometeret?
- Er bærevæsken, oppgitt som "PBS" i prosedyren deres, den samme løsningen som benyttes ved vasking: "Filtrert PBS med 0,2% BS + 2mM EDTA".
- I forrige mail skrev dere at dere hovedsakelig benytter LST- og KLL-rør ved diagnostikk av KLL. Stemmer det at dette kun er rør nr. 2 og 3 i B-cellepanelet deres?
- Når det kommer til volum for antistoff står det i prosedyren at det er oppgitt på panel eller på oversikt på benk ved vindu. Volum er ikke oppgitt på panelet, og vi lurte derfor på om dere har mulighet for å sende oss denne oversikten.
- Telles WBC i prøvematerialet før eller etter vasking?
- Vasker dere alle blod- og beinmargsprøver minst 2 ganger?

Vennlig hilsen
Sunniva Asprem og Mari Hamre Bu
Bioingeniørstudenter
NTNU Trondheim

Svar via e-post fra kontaktperson i Oslo

Svar på første e-post:

Hei!

Så gøy at dere skal skrive oppgave om flowcytometri! Jeg hjelper dere gjerne.

Sender med vår prosedyre for immunfarging som er basert på EuroFlow sin SOP for Sample preparation (noen lokale tilpasninger).

Vårt B-cellepanel er en blanding av EuroFlow sine kombinasjoner og egenkomponerte antistoffkombinasjoner. LST- og KLL-rørene er hovedsakelig de som brukes for diagnostikk av KLL. Vi gjør også en prognostisk analyse hvor vi måler CD38-uttrykk på KLL-celler.

Som diagnoseverktøy bruker våre hematopatologer «WHO Classification of Tumours of Haematopietic and Lymphoid Tissue», Swerdlow et.al. 2017, hvor man setter en diagnose ved å integrere resultater fra flere metoder, inkludert immunfenotyping (flowcytometri), morfologi, molekylærgenetikk og kliniske manifestasjoner.

Ikke nøl med å spørre hvis dere lurer på noe!

Lykke til 😊

Med vennlig hilsen,

Ingunn Østlie, spesialbioingeniør/MSc

Enhet for flowcytometri

Avdeling for patologi



Tlf: 22 78 24 54

Svar på andre e-post:

Heil

Se svar under ☺

God helg og lykke til!

Med vennlig hilsen,

Ingunn Østlie, spesialbioingeniør/MSc
Enhet for flowcytometri
Avdeling for patologi



Tlf: 22 78 24 54

- Hvilket flowcytometer benytter dere ved immunfenotyping? **Vi bruker BD FACS Lyric flowcytometer**
- Benytter dere EuroFlow SOP for set-up og kompensasjon ved innstilling av flowcytometeret? **Ja det gjør vi. For FACS Lyric innebærer dette at vi laster opp filer for «Labels», «Reagents» og «Assays» fra Euroflow.org sine sider, og følger deres SOP for instrumentinnstilling og kompensasjon (se vedlegg).**
- Er bærevæsken, oppgitt som "PBS" i prosedyren deres, den samme løsningen som benyttes ved vasking: "Filtrert PBS med 0,2% BS + 2mM EDTA". **Inntil nylig brukte vi ren PBS som bærevæske (ikke vaskebuffer), men nå har vi byttet over til FACS Flow sheath fluid.**
- Når det kommer til volum for antistoff står det i prosedyren at det er oppgitt på panel eller på oversikt på benk ved vindu. Volum er ikke oppgitt på panelet, og vi lurte derfor på om dere har mulighet for å sende oss denne oversikten. **Se vedlegg ☺**
- Telles WBC i prøvematerialet før eller etter vasking? **Vi teller WBC før vasking.**
- Vasker dere alle blod- og beinmargsprøver minst 2 ganger? **Ja det stemmer.**
- I forrige mail skrev dere at dere hovedsakelig benytter LST- og KLL-rør ved diagnostikk av KLL. Stemmer det at dette kun er rør nr. 2 og 3 i B-cellepanelet deres? **JA ☺ - men:**
Jeg har også dobbeltsjekket med vår hematopatolog Ida Ikonomou:
KLL diagnostiseres med flow i de tilfellene man har en typisk KLL-immunfenotype (jf WHO). Da vil LST-røret gi en sterk mistanke ved en populasjon med svakt CD20-uttrykk, CD5+ og svak lettjede kappa eller lambda. KLL-røret bekrefter med CD79b-, CD200+, CD23+ og CD43+. Hos oss på Radiumhospitalet lager vi også blod- og beinmargsutstryk. Hematopatologen benytter morfologi som en intern-kontroll. I tillegg spiller absolutt lymfocytt-tall inn.

Dersom man ser avvik fra en typisk KLL-fenotype, dvs. mistanke om en atypisk KLL, bes rekvirenten om å ta en beinmargsbiopsi for utvidete undersøkelser.

Man skiller også mellom KLL og MBL (monoklonal B-cellelymfocytose). Pasienter med MBL er friske, men kan ha en minimal B-celleklon med f.eks. KLL-fenotype som oppdages tilfeldig, som de kan gå med hele livet uten å merke noe av. MBL kan også utvikle seg til KLL. Man skiller mellom Low-count MBL og High-count MBL. For å skille mellom KLL og MBL ser man på lymfocytt-tall og kliniske manifestasjoner (jf. WHO).

Svar via e-post fra kontaktperson i Bergen

Svar på første e-post:

Hei Mari

Så spennende oppgave. Vedlagt er prosedyren vi bruker til immunfenotyping av pasienter med KLL. Ved mistanke om KLL setter vi opp følgende paneler: LST, 1K, 1G, B-CLPD1 og B-CLPD2.

Jeg har også lagt ved hvilke antistoff som er i de ulike panelene vi benytter ved mistanke om KLL. 1K og 1G er «in-house» paneler, de resterende er paneler utarbeidet av Euroflow. Dere må bare ta kontakt dersom jeg kan hjelpe med noe annet.

Jannike Lundervik Sælen

Seksjonsleder

Seksjon for flowcytometri

Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin

55974639/90032012

Haukeland universitetssjukehus

www.helse-bergen.no



Svar på andre e-post:

Hei Sunniva og Mari

Vi har 2 stk BD FACSCanto flowcytometer, og vi bruker Euroflow SOP for setup og kompensering til innstilling av disse instrumentene. Vi bruker rainbowbeads som anbefalt i SOP, og har valgt å kompensere med BD comp beads (ikke levende celler).

Vi har også 2 stk. BD FACDSLytic flowcytometer og der benytter vi også Euroflow SOP, men dette er en SOP som er utarbeidet spesielt for dette instrumentet. Her brukes det ikke rainbowbeads til innstilling av instrumentet, men kuler som følger med instrumentet. Her bruker vi både BD sine egne FC beads kombinert med Ultra comp beads.

Gi meg en lyd om dere trenger flere detaljer eller om noe var uklart.
Lykke til

Vennleg helsing

Jannike Lundervik Sælen

Seksjonsleder

55974639 / +4790032012

Haukeland universitetssjukehus

www.helse-bergen.no

Svar via e-post fra kontaktperson i Tromsø

Svar på første e-post:

Hei,

Håper at dette er til hjelp og at dere finner ut av det. Vi har ikke spesifikk prosedyre for KLL. Som alle andre leukemier/lymfomer og lignende oppdages det hos oss etter at vi har mottatt prøvemateriale (blod/benmarg/lymfeknute/tumor biopsi/aspirat/annen kroppsvæske) og utført screening av cellesuspensjon med eluerte celler. Etter screening som viser svar suspekt på KLL settes det utvidet panel og endelig diagnose settes hvis immunfenotype og kvalitets krav for antall klonale B-celler i perifert blod er oppfylt (e.g. $> 5 \times 10^9/L$). Det skal også oppgis KLL-score ved svarutgivelse (Moreau E.J., Matutes E., A'Hern R.P., Morilla A.M., Morilla R.M., Owusu-Ankomah K.A. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b) *Am J Clin Pathol.* 1997;108(4):378–382.).

Hvis det er vanskelig for dere å finne ut av det kan vi gjerne ta en prat om det dere evt. lurer på.

Lykke til med oppgaven og hilsen
Goran

Med vennlig hilsen

Goran Kaurić
Spesialbioingeniør
Tlf: +47 776 26 293

Universitetssykehuset Nord-Norge HF
Laboratoriemedisin, v/Flowcytometri
Sykehusvegen 38
9038 Tromsø, Norge

Svar på andre e-post:

Hei,

Vi bruker FACSCanto II (4+2+2 laserkonfigurasjon), og ja vi bruker EUROFLOW SOP for instrument setting og kompensasjon.

Med vennlig hilsen

Goran Kaurić
Spesialbioingeniør
Tlf: +47 776 26 293

Universitetssykehuset Nord-Norge HF
Laboratoriemedisin, v/Flowcytometri
Sykehusvegen 38
9038 Tromsø, Norge