

ПРЕПОРЪКИ

ЗА ПРЕ-АНАЛИТИЧНА ФАЗА НА ИМУНОФЕНОТИПИЗАЦИЯТА НА ХЕМАТОЛОГИЧНИ НЕОПЛАЗИИ ЧРЕЗ ФЛОУЦИТОМЕТРИЯ

Работна среща Стандартизация на имунофенотипизацията чрез флоуцитометрия в хематологията – София, 2011

СЪДЪРЖАНИЕ

- ❑ Материали за изследване
 - ❑ Основни принципи на флоуцитометричното изследване в онкохематологията
 - ❑ Анализ на хемопоетични популации в зависимост от медицинските индикации
 - ❑ Основни принципи за конструиране на панели
 - ❑ Осигуряване на качество
-

МАТЕРИАЛИ

ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛЕВКЕМИИ И ЛИМФОМИ (1)

➡ **Костен мозък (кръв при бласти $>30G/L$ * $>80\%$ *фиброза):**

- предпочита се аспирация от илиачна кост (<кръв)
- по-недиференцирани бласти в костния мозък
- преди провеждане на лечение (цитостатици, колонио-стимулиращи фактори, интерферон, кортикостероиди)

➡ **Обем:**

- 2-5 мл (първите 0,2 mL за цитология, следващ 1 mL за флоуцитометрия ± други изследвания)
- ако са няколко епруветки (смесване или броене на клетките и избор)

➡ **Антикоагулант:**

- EDTA.K (2 mg/mL) – намалява агрегацията на Gr, Thr, но до 24h
 - Na Heparin (200 U/mL) – проблеми с морфология, фиксация, пермеабилзация, но стабилни до 48h
 - ACD – най-добра viability до 72h
-

МАТЕРИАЛИ

ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛЕВКЕМИИ И ЛИМФОМИ (2)

► **Транспорт и съхранение:**

- на стайна температура (10 - 25 °C)
- не се замразява, не се държи в хладилник
- не се държи на слънчева светлина
- няма нужда от среди, нито от стабилизатори (промяна във физичните свойства, антигенните епитопи)

► **Броене:**

- изброяване на клетките от пробата, която подлежи на анализ
- добре е съпоставка с данните от извън-лабораторното броене

► **Морфология:**

- оценка на морфологията на пробата, която подлежи на анализ
 - оценка на клетъчния интегритет, степента на хемодилуция, клетъчно разрушаване
-

МАТЕРИАЛИ

ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛЕВКЕМИИ И ЛИМФОМИ (3)

► Работа с цяла кръв/костен мозък:

- клетъчна концентрация $<10 \times 10^6/\text{mL}$
 - обем на антителата спрямо обем от 50 μL кръв за епруветка
 - антителата се използват в условия на излишък
 - Лизиращи процедури
 - Фиксация
 - Пермеабилзация за цитоплазмени/ядрени маркери
-

МАТЕРИАЛИ

ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛЕВКЕМИИ И ЛИМФОМИ (3)

► Работа с цяла кръв/костен мозък:

► Лизиращи разтвори

- NH_4Cl : <8-10 мин., може да се използва преди имуномаркиране
 - При използване на lysed/washed клетки: блокиране на Fc receptors с Ig препарати, human AB serum, BSA или животински серум от същия вид, от който са използваните антитела.
 - Комерсиални лизиращи разтвори – фиксират и леко пермеабilizират → след имуномаркиране
 - “lyse & wash” vs “no wash” според избора на лабораторията
-

МАТЕРИАЛИ

ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛЕВКЕМИИ И ЛИМФОМИ (3)

► Работа с цяла кръв/костен мозък:

► Фиксация

- Paraformaldehyde (0.1 - 0.5% в PBS) – предотвратява процесите на capping и ендоцитоза от живата клетка, в резултат на което може да доведе до загуба на сигнал.
 - +4°C и/или добавяне на 1‰ sodium azide в промивания буфер (запазва флуоресценцията за няколко дни, вирусна инактивация).
 - Фиксацията не е необходима, ако анализираме веднага, но добавянето на 1‰ Na azide в PBS е добра практика.
-

МАТЕРИАЛИ

ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛЕВКЕМИИ И ЛИМФОМИ (3)

► Работа с цяла кръв/костен мозък:

► Пермеабилзация

- Последователността на процедурите следва да е: **фиксация + пермеабилзация + маркиране.**
 - При комбинирано мембранно и цитоплазмено маркиране последователността на процедурите е: **мембранно маркиране + лизиране + пермеабилзация + цитоплазмено маркиране + промиване ± фиксация.**
 - Ethanol - осигурява както фиксация, така и пермеабилзация
 - Комерсиални пермеабилзиращи разтвори
 - “in house” 1% saponin
 - Очаква се промяна в FSC/SSC
-

МАТЕРИАЛИ

ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛЕВКЕМИИ И ЛИМФОМИ (3)

► Работа със сепарирани клетки:

► Ficoll Нураque, 1.077

- Стайна температура
 - Разредена проба (1V/1V) върху 1V Ficoll.
 - Центрофугиране около 20 min при 600g, без спиращка (!).
 - Бърза колекция на клетките от пръстена и промиване в голям обем ~15mL PBS или Hank's или RPMI1640 , центрофугиране при 800g.
 - Ако има еритроцити първото промиване да е с NH₄Cl.
 - Сепарирането с Ficoll може да доведе до селекция или загуба на определени клетъчни популации (!)
 - Контрол на морфологията (цитоспин) и FSC/SSC
-

МАТЕРИАЛИ

ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛЕВКЕМИИ И ЛИМФОМИ (3)

- **Телесни течности (ликвор, плеврална, асцитна течност)**
 - не е необходима стъпка на лизиране
 - възможно най-бърза обработка на материала
 - изброяване на клетките

 - **Лимфен възел, костномозъчна биопсия**
 - ограничения в интерпретацията
-

МАТЕРИАЛИ

ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛЕВКЕМИИ И ЛИМФОМИ (3)

► Биобанкиране:

- валидирани протоколи за замразяване на витални клетки
 - валидирани протоколи за размразяване на витални клетки
 - замразени цитологични и цитоспин препарати
-

ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ НА ФЛОУЦИТОМЕТРИЯТА В ОНКОХЕМАТОЛОГИЯТА

- Основната цел на FCM е да отговори на клиничните индикации (от изпращащия лекар) – т.е. изследването трябва да е необходимо и подходящо.
 - Панелът трябва да позволява анализ на всички основни клетъчни популации в пробата, без да е задължително идентифицирането на всеки един хемопоетичен клетъчен тип.
 - FCM изследване трябва да е достатъчно изчерпателно, за да идентифицира основните категории хемопоетични неоплазии, които съответстват на клиничното състояние.
- * Това не означава, че първоначалният панел следва да съдържа всички маркери за пълно характеризиране на диагностичните възможности, но трябва да дава възможност за установяването им с адекватна степен на чувствителност, така че да бъдат предприети допълнителни тестове за окончателна диагноза, класифициране и оценка на риска.
-

ИЗБОР НА ПАНЕЛ ЗА ФЛОУЦИТОМЕТРИЯ В ОНКОХЕМАТОЛОГИЯТА

Изборът на първоначален панел зависи от:

- Вида на изпратения материал (кръв, костен мозък, друг)
- Данните от морфологичната оценка (ако има такава)
- Медицинските индикации, посочени в направлението
- Клиничната история

Не се препоръчва използване на ограничени комбинации от антитела, освен ако:

- Ограничения от страна на пробата (количество, брой клетки)
 - Тясно насочен от морфологията въпрос
 - Съвсем наскоро поставена диагноза на хематологична неоплазия (насочено търсене на ангажиране)
-

АНАЛИЗ

НА КЛЕТЪЧНИ ПОПУЛАЦИИ ↔ МЕД. ИНДИКАЦИИ

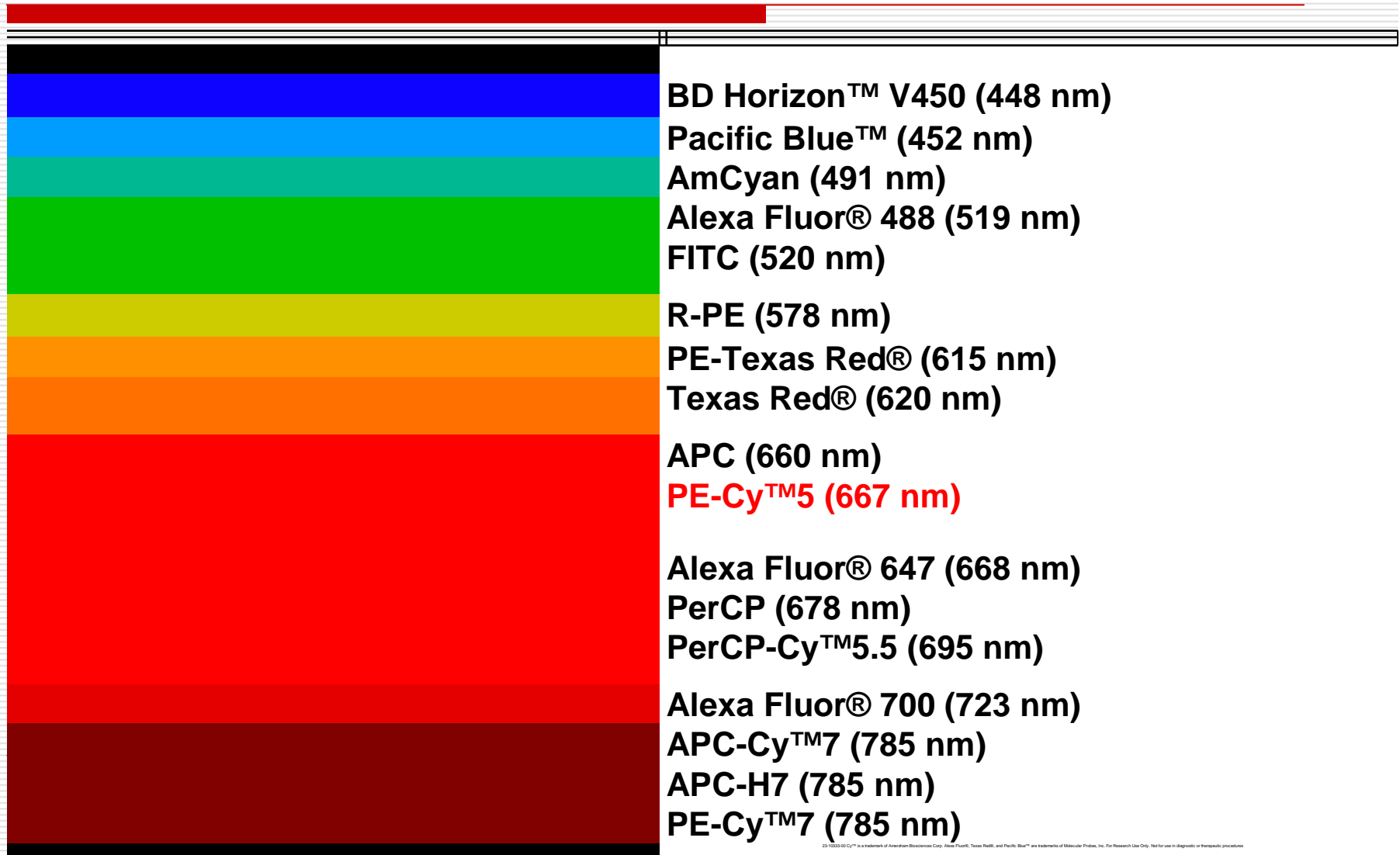
Цитопении (Er,Thr,Leu, pan)	B, T, My, Pl
Левкоцитоза (Gr, Mo)	My
Лимфоцитоза	B, T, (NK)
Еозинофилия	T, My, (B)
Бластни клетки в п.кр/к.мозък	B, T, My
Спленомегалия и/или лимфаденомегалия	B, T
Стадиране на B-клетъчен лимфом	B
Стадиране на T-клетъчен лимфом	T
Ходжкинов лимфом	FCM не е подходяща
Моноклонална гамапатия	B, Pl
Абнормно завишени плазмоцити в к.мозък	B, Pl

ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ ЗА КОНСТРУИРАНЕ НА ПАНЕЛИ В ХЕМАТОЛОГИЯТА

- Антигени с висока експресия – dim флуорохроми и обратно.
 - Поне един общ маркер във всички епруветки (проследяване на анализиранията популация) – не винаги е възможно.
 - CD45 vs SSC (проследяване на популацията в епруветките, “диференциално”, идентифициране на абнормна популация, оценка на качеството между епруветките)
 - Линейно-асоциирани антигени versus side scatter (CD19, CD3)
 - Антигени, асоциирани с матурационен стадий (CD34)
 - FSC versus SSC (не е препоръчителен)
 - Антигени за идентифициране на субпопулации се комбинират с линейно-асоцииран антиген
 - Антигени от ранни стадии на матурацията се комбинират с късни
-

ФЛУОРОХРОМИ

СПЕКТРАЛНО РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ СПОРЕД ЕМИСИИТЕ



QA

ПРИ ИМУНОФЕНОТИПИЗАЦИЯ В ХЕМАТОЛОГИЯТА

За осигуряване на качеството се изисква сравнение на флуоцитометричните находки с външни източници на информация:

- Клинични данни.
- Предходни флуоцитометрични изследвания.
- Морфологична оценка (по време на изследването, корелация на резултатите и коментар на несъответствията)
- Други изследвания върху същия материал (хематологични анализатори, цитогенетика, молекулярни, ИНС изследвания)
- Клонални имуноглобулини в серум и урина

Всяко разминаване следва да се отрази в резултата, да се коментира, да се препоръчат начини за изясняването му.

REFERENCES

- ❑ WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC, 2008
 - ❑ Standards / SOP's of Project 10: Diagnostics. <http://www.leukemia-net.org>
 - ❑ ELN - WP10 - Consensual European immunophenotyping panels for leukemia. Final version, 2005, <http://www.leukemia-net.org>
 - ❑ ELN - WP10 - Consensual recommendations on preanalytical precautions for the immunophenotyping of leukemia and immunoproliferative disorders. <http://www.leukemia-net.org>
 - ❑ 2006 Bethesda International Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematolymphoid Neoplasia by FCM: Optimal Reagents and Reporting for the Flow Cytometric Diagnosis of Hematopoietic Neoplasia. Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 72B:S14–S22 (2007)
 - ❑ Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: a reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL, Cytometry B Clin Cytom. 2010;78(1):4-10.
-



НАЦИОНАЛНА СПЕЦИАЛИЗИРАНА БОЛНИЦА
ЗА АКТИВНО ЛЕЧЕНИЕ НА ХЕМАТОЛОГИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ - ЕАД, гр. София



Център за върхови постижения
ТРАНСЛАРАЩИ ИЗСЛЕДВАНИЯ В ХЕМАТОЛОГИЯТА

Екип

М. Генова – зав.лаборатория
В.Николова, Л.Гърчева
Й. Димитров, Т. Диков
В. Шиваров, Н.Стоянов
А.Михова, Ц.Янчева
Г.Балаценко, С.Ангелова

Медицински лаборанти

Магдалена Костова
Пламенка Йотова
Лиляна Лазарова
Елеонора Бойчева
Елиза Костадинова



Education
and
Training



ФОНД
НАУЧНИ
ИЗСЛЕДВАНИЯ