



Het afnemen, bewaren en voorbereken van patiëntenmateriaal ten behoeve van immunofenotypering

- Een overzicht van gepubliceerde data en ervaring van experts uit het veld -

1. Doel

Het afnemen en conserveren van patiëntenmateriaal opdat zo min mogelijk veranderingen optreden in de immunofenotypering ten opzichte van vers materiaal.

In deze notitie wordt een samenvatting gegeven van de meest recente kennis over pre-analytische randvoorwaarden voor de klinische flowcytometrie van de meest voorkomende bepalingen. Dit zijn de testen voor leukemie/lymfoom typering. CD34, HLA-B27, lymfocytensubsets, FMT, PNH in verschillende materialen zoals bloed, beenmerg, liquor, biopten en andere lichaamsvochten.

De verschillende randvoorwaarden zoals temperatuur, fixatief, anticoagulans en dergelijke zijn per test en per materiaal gerangschikt. De lijst is samengesteld met behulp van brondocumenten (zie referentielijst) en kennis en ervaring van de werkgroepleden. De lijst is zeker niet volledig. Het doel van dit document is de lezer handvatten te geven aan welke randvoorwaarden de testen moeten voldoen en de literatuur aan te bieden om e.e.a. na te lezen en in het kwaliteitshandboek te gebruiken. Het doel is om een zoveel mogelijk gestandaardiseerd platform in Nederland te krijgen voor de routinematige testen met behulp van meer kleuren flowcytometrie om de kwaliteit van de gehele groep te verbeteren.

2. Beginsel

Wanneer men leukocyten in patiëntenmateriaal ten behoeve van immunofenotypering enige tijd wil bewaren, moet het medium waarin het patiëntenmateriaal na afname opgevangen en bewaard wordt aan de volgende eisen voldoen: antistollingsmiddel bevatten en geen belemmering vormen voor de isolatie van cellen. Bloed en beenmerg zijn voldoende eiwitrijk door de aanwezigheid van serumalbumine. Voor vele andere patiëntenmaterialen geldt dat een transportmedium toegevoegd moet worden dat voldoende eiwitrijk is en op een fysiologisch pH gebufferd is.

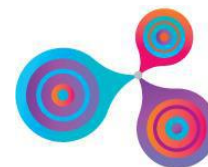
3. Definities

K ₂ EDTA	Dikaliummethyleendiamine-tetra-acetaat
Na-heparine	Natrium-heparine
Li- Heparine	Lithium Heparine
kT	Kamertemperatuur

4. Toepassingsgebied

Alle patiëntenmaterialen die afgenomen en vervoerd moeten worden ten behoeve van immunofenotypering.

Preanalyse Definitief



Tabel 1. Pre-analytische bewaarcondities.

Materiaal	Anticoagulans	Bewaar medium	Max. houdbaarheid (uur)	Bewaar temp (°C)	Referentie
Beenmerg	Li-heparine	geen	48-72	KT	1,2,3
	EDTA	geen	12-24	KT	1,2,3
perifeer bloed	Li-heparine	geen	48	KT	1,2,3
perifeer bloed, alleen klonaliteit analyse	Li-heparine				
of EDTA	geen	72	4	3	
perifeer bloed	EDTA	geen	12-24	KT	1,2,3
liquor	geen	geen	1	KT	4
liquor	geen	Transfix	24	4	4
liquor	geen	RPMI+20%BSA	24	4	5
pleuravocht	geen	geen	24	4	3
ascites	geen	geen	24	4	3
lymfklier biopt/punctaat	geen	geen	24	4	3
lymfklier biopt/punctaat	geen	RPMI+20%BSA	72	4	
oogvocht	geen	geen	24	4	3
BAL	geen	geen	4	0-4*	11
CD34	EDTA of Li-heparine	geen	12-24	KT	9
PNH leucocyten,					
Erythrocyten	Li-heparine of EDTA	geen	48u, 7 dagen voor erythrocyten	4	10,17
FMT/HbF	EDTA	geen	72	4	13
HLA-B27	EDTA	geen	12-24	KT	

*Na analyse beoordeelt de Labspecialist of de uitslagen kwalitatief voldoende zijn om te rapporteren.

Tabel 2. Voorbewerkingstappen: lyseren, wassen, incubatie en vitaliteitsanalyse.

vraagstelling	Lyseren*	Wassen*	Incuberen* (minuten)	vitaliteit**	Opmerking /referentie
lymfocyten subsets, incl CD4 abs	Ja	3x	15-30	nee	
CD34 absoluut	Ja	3x	15-30	ja	
leukemie/lymfroom	Ja	3x	15-30		
immuundeficiëntie	Ja	3x	15-30		
BAL	Nee	1x	15-30		11
liquor	Nee	1x	15-30	Ja, bij veel bloed bijmenging	
div vochten	Nee	1x	15-30	Ja, bij veel bloed bijmenging	
lymfeklier biopt	Nee	1x	15-30	ja	
MRD	Ja	3 x	15-30		
MDS	Ja	3 x	15-30		7

* Afhankelijk van het gebruikte protocol

** PI of 7-AAD of Drag7 voor dode cellen



5. Literatuur

1. ELN - WP10 - Consensual recommendations on preanalytical precautions for the immunophenotyping of leukemia and immunoproliferative disorders
2. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. U.S.-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry* 1997; 30: 214-30.
3. Johansson et al. Guidelines on the use of multicolour flow cytometry in the diagnosis of haematological neoplasms. *Brit J Haematol.* 2014; 165: 455-88.
4. de Jongste AH, Kraan J, van den Broek PD, Brooimans RA, Bromberg JE, van Montfort KA, Smitt PA, Gratama JW. Use of TransFix™ cerebrospinal fluid storage tubes prevents cellular loss and enhances flow cytometric detection of malignant hematological cells after 18 hours of storage. *Cytometry B Clin Cytom.* 2014; 86: 272-9.
5. Renshaw SA, Gupta S, Campos M, Hodes L, Renshaw AA, Gould EW. The addition of RPMI significantly improves the cellularity of cerebrospinal fluid cytology specimens over time. *Cancer Cytopathol.* 2013; 121: 271-4.
6. Bone marrow collection, Youtube
7. Euroflow document referentie <https://euroflow.org/usr/pub/qa.php>
8. NVC verificatie document inklaren antistoffen: NVC en VHL website
9. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Cytometry.* 1998; 34: 61-70
10. Sutherland DR1, Keeney M, Illingworth A Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012; 82: 195-208.
11. BAL consensus protocol, NVC werkgroep BAL (www.cytometrie.nl)
12. Brooimans RA, Kraan J, van Putten W, Cornelissen JJ, Löwenberg B, Gratama JW. Flow cytometric differential of leukocyte populations in normal bone marrow: influence of peripheral blood contamination. *Cytometry B Clin Cytom.* 2009; 76: 18-26.
13. <http://www.iqproducts.nl/products/perinatal/fetal-cell-count-kit-diagnosis-of-fetomaternal-hemorrhage/of-fetomaternal-hemorrhage/>
14. Shabnam Tanqri, Validation of Cell-based Fluorescence Assays: Practice Guidelines from the ICSH and ICCS- Part III - Analytical Issues *Cytometry: Part B (Clinical Cytometry)* 84B:291-308 (2013)
15. Bruce H. Davis, Validation of Cell-based Fluorescence Assays: Practice Guidelines from the ICSH and ICCS. - Part II - Preanalytical Issues *Cytometry: Part B (Clinical Cytometry)* 84B:286-290 (2013)
16. Richtlijn paroxysmale nachtelijke hemoglobinurie. Landelijke werkgroep PNH, NvVH, S. Langemeier, Nijmegen 2016