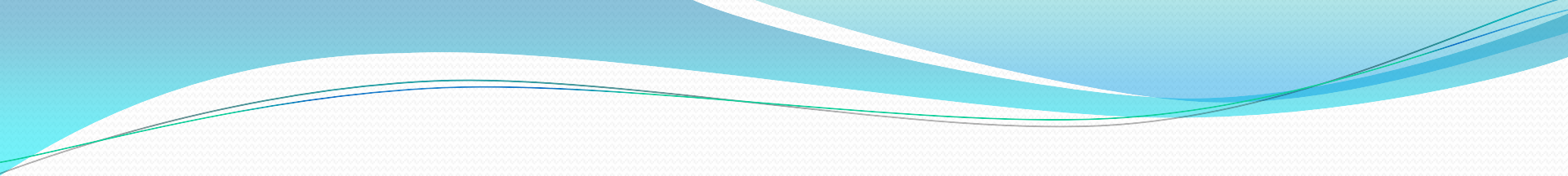


ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

**Κώνστα Ευγενία, Χημικός, PhD και Βικεντίου Μυροφόρα, Χημικός, PhD
Επιστημονικοί Συνεργάτες, Β΄ Παθολογική Προπαιδευτική Κλινική,
Αιματολογική Μονάδα, Π.Γ.Ν “Αττικόν”**



ΠΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΦΑΣΗ

ΑΣΦΑΛΕΙΑ

- Όλα τα δείγματα των ασθενών και γενικά τα εργαστηριακά δείγματα θα πρέπει να θεωρούνται ως εν δυνάμει μολυσματικά. Πρέπει να τα χειρίζεται κανείς σύμφωνα με τα διεθνή μέτρα προφύλαξης
 - Μολυσματικό δείγμα: Οποιοδήποτε δείγμα μπορεί να περιέχει έναν παράγοντα μόλυνσης, ο οποίος δύναται να οδηγήσει σε παθολογική κατάσταση εάν δεν το χειριστεί κανείς σωστά
 - Τα μέτρα προφύλαξης είναι κατευθυντήριες οδηγίες που συνδυάζουν τα κυριότερα στοιχεία «των παγκοσμίων μέτρων προφύλαξης και των τεχνικών απομόνωσης ουσιών του ανθρωπίνου σώματος»
- * Garner JS, Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for isolation precautions in hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1996;17:53-80

Συλλογή Δείγματος

- Συλλογή περιφερικού αίματος σύμφωνα με την πρόσφατη έκδοση του CLSI document M29 - *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections*
- Αποφυγή τραυματισμού με βελόνα
- Απόρριψη βελονών σε ειδικό κάδο απορριμμάτων – μιας χρήσης (όταν γεμίσει να σφραγιστεί και να απορριφθεί)
- Οι βελόνες πρέπει να λυγίσουν, να κοπούν ή να απομακρυνθούν από τη σύριγγα πριν από την απόρριψή τους

Ενδυμασία Ασφάλειας

- Γάντια και εργαστηριακές μπλούζες θα πρέπει να χρησιμοποιούνται από όλο το προσωπικό που διενεργεί εξετάσεις και έρχεται σε επαφή με δείγματα
- Προστατευτικά γυαλιά ή προστατευτικό πλαίσιο κατά τη χρήση επικίνδυνων ουσιών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για αποφυγή έκθεσης ματιών, μύτης και στόματος
- Αλλαγή γαντιών και πλύσιμο χεριών μετά την ολοκλήρωση εργασίας και πριν την αναχώρηση από το εργαστήριο

Απαγωγοί Αερίων (Θάλαμοι Βιολογικής Ασφάλειας)

- Εάν είναι δυνατό, διεξαγωγή εργασίας σε θάλαμο βιολογικής ασφάλειας (τάξης I ή II)
- Εάν δεν είναι δυνατό, θα πρέπει να διεξάγονται σε θάλαμο βιολογικής ασφάλειας τουλάχιστον όλες οι διαδικασίες που ενδέχεται να δημιουργήσουν σταγονίδια ή aerosol (π.χ. διαδικασία μηχανικής ανακίνησης, άνοιγμα σωληνάρων αιμοληψίας (κενού))

Δοχεία Συλλογής Δειγμάτων

- Όλα τα δείγματα θα πρέπει να χωρίζονται σε κλάσματα (aliquots) και να τοποθετούνται σε σωληνάρια που έχουν πώματα ή σε πλάκες μικροτιτλοποίησης που έχουν προστατευτικά καλύμματα
- Τα πώματα και τα προστατευτικά καλύμματα θα πρέπει να είναι πάντα στη θέση τους

Φυγοκέντρηση

- Αποφυγή δημιουργίας aerosols εάν τα δείγματα φυγοκεντρούνται (π.χ. σε σφραγισμένα σωληνάρια ή μέσα σε δοχεία ασφαλείας)

Πιπετάρισμα (Pipetting)

- Αναρρόφηση (pipetting) δια στόματος **δεν επιτρέπεται**
- Θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία από τις ακόλουθες τεχνικές:
 - ❖ Ηλεκτρονική αναρρόφηση
 - ❖ Ανάστροφη αναρρόφηση (reverse pipetting)
 - ❖ Τεχνική prewetting (βρέχουμε το ρύγχος και μετά πιπετάρουμε κανονικά)
 - ❖ Ρομποτικό σύστημα αναρρόφησης

- Όσο το δυνατόν αποφυγή χρήσης αιχμηρών συσκευών (π.χ. βελόνες, γυάλινες pipettes Pasteur και γυάλινα σωληνάρια) και σωστή απόρριψη
- Ισχύουν οι κανονισμοί απόρριψης βιολογικών και τοξικών δειγμάτων που ισχύουν στη χώρα (www.eekx-kb.gr)

[illegible]

- Εάν χυθεί αίμα ο χώρος θα πρέπει να απολυμανθεί άμεσα με ένα κατάλληλο αντιδραστήριο, όπως αραιωμένο 1:10 υποχλωριώδες νάτριο 0,71mol/L (μη αραιωμένη οικιακή χλωρίνη), ή κατάλληλα αραιωμένα μυκοβακτηριοκτόνα απολυμαντικά

* Most current edition of CLSI/NCCLS document GP17- *Clinical Laboratory Safety*

Διαχείριση Αποβλήτων και Αδρανοποίηση Δειγμάτων

- Η συλλογή χρησιμοποιούμενων δειγμάτων και εργαστηριακών αντιδραστηρίων και αναλωσίμων (συμπεριλαμβανομένων βελονών και αιχμηρών αντικειμένων), σε κατάλληλους κάδους απορριμμάτων
- Διαχείριση αποβλήτων με κατάλληλους τρόπους (π.χ. αποτέφρωση ή χρήση αυτόκαυστου), σύμφωνα με τους εθνικούς κανονισμούς ασφάλειας
- Αδρανοποίηση δειγμάτων με χημικές τεχνικές: ανάμειξη δειγμάτων με ευρύ φάσμα ιωδιούχων διαλυμάτων ή χλωρίνης για 24 ώρες και κατάλληλη απόρριψη
- ❖ Αποφυγή χρήσης της μεθόδου της χλωρίνης με λυτικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου, καθώς ελευθερώνεται επικίνδυνο αέριο χλωρίου
- Απόρριψη αποβλήτων ΚΡ στην κανονική αποχέτευση λόγω μεγάλης αραίωσης των επιβλαβών διαλυμάτων

* Current edition of CLSI/NCCLS document GP5 – *Clinical Laboratory Waste Management*

Αποθήκευση Δειγμάτων

- Για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (ΚΡ), μετά τη διαδικασία χρώσης ακολουθεί το τελευταίο στάδιο φυγοκέντρησης και στη συνέχεια γίνεται ανασύσταση των δειγμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (pH=7,0-7,4) παραφορμαλδεΰδης ή φορμαλδεΰδης (συνήθως 0,1-2,0%) προκειμένου να απολυμανθεί και αποθήκευση στους 4°C μέχρι την ανάλυσή τους
- ❖ Χρήση μόνο NH₄Cl ως λυτικού μέσου δεν συμβάλλει στην απενεργοποίηση ιών όπως ο HIV, γι' αυτό και μετά το χρόνο λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων απαιτείται προσθήκη παραφορμαλδεΰδης (φύλαξη στους 4°C - δεν δίδεται ο ελάχιστος χρόνος παραμονής του δείγματος στους 4°C προκειμένου το δείγμα να απολυμανθεί)
- ❖ Υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα διαλύματα που περιέχουν μονιμοποιητικές ενώσεις που ελαττώνουν 3-5log τους μολυσματικούς παράγοντες
- Η μονιμοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιείται επίσης για τη σταθεροποίηση των δειγμάτων ώστε να μπορούν να αναλυθούν αργότερα
- Λόγω της ποικιλίας των τεχνικών προετοιμασίας και μονιμοποίησης των δειγμάτων με βάση τα λυτικά διαλύματα και τον τύπο/την συγκέντρωση των μονιμοποιητικών, ποικίλλει και ο ελάχιστος (για απολύμανση του δείγματος) και ο μέγιστος χρόνος (για αξιόπιστη ανάλυση) αποθήκευσης των δειγμάτων
- Για την εγκυρότητα της ανάλυσης, θα πρέπει να επαληθευτεί από το εργαστήριο η συγκέντρωση της παραφορμαλδεΰδης / φορμαλδεΰδης και ο μέγιστος χρόνος αποθήκευσης των δειγμάτων (έλεγχος μέχρι τότε το δείγμα παραμένει αναλλοίωτο με τα συγκεκριμένα αντιδραστήρια εργαστηρίου)

Μη μονιμοποιημένα Δείγματα

- Όταν αναλύονται μη μονιμοποιημένα δείγματα στον κυτταρομετρητή ροής, το εργαστήριο θα πρέπει να χρησιμοποιεί κατάλληλες διαδικασίες βιοασφάλειας ώστε να ελαχιστοποιεί την έκθεση σε μολυσματικά υλικά
- ❖ Λειτουργία οργάνου σύμφωνα με τις συστάσεις βιοασφάλειας της κατασκευαστικής εταιρείας

Απολύμανση Εξοπλισμού

- Το δοχείο αποβλήτων του κυτταρομετρητή ροής θα πρέπει να περιέχει 1:10 του όγκου του 0,71 mol/L υποχλωριώδες νάτριο (μη αραιωμένη οικιακή χλωρίνη)
- Απολύμανση του εργαστηριακού εξοπλισμού με γνωστό διάλυμα αδρανοποίησης μολυσματικών παραγόντων ή 10% διάλυμα οικιακής χλωρίνης
- ❖ Most current edition of CLSI document M29 – *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections*

Σήμανση Δειγμάτων και Παραπεμπτικό Εξέτασης

Απαιτήσεις

- Είναι απαραίτητο να εξασφαλίζεται η ιχνηλασιμότητα των δειγμάτων.
- Όλα τα δείγματα που υποβάλλονται για εξετάσεις θα πρέπει να σημαίνονται άμεσα με τα στοιχεία του ασθενούς και την ημερομηνία και ώρα της συλλογής τους. Η σήμανση με barcode είναι επιθυμητή.
- Όταν πολλαπλά δείγματα συλλέγονται για ανάλυση από τον ίδιο ασθενή, το είδος των δειγμάτων θα πρέπει να καταγράφεται ξεκάθαρα στο σωληνάριο ή στο δοχείο (π.χ. περιφερικό αίμα και μυελός των οστών από τον ίδιο ασθενή)
- Παραπεμπτικό εξέτασης θα πρέπει να συνοδεύει όλα τα δείγματα και να περιλαμβάνει:
 - Στοιχεία ασθενούς
 - Διαφορική διάγνωση
 - Ηλικία
 - Φύλο
 - Σχετική φαρμακευτική αγωγή ή πρόσφατη θεραπεία (συμπεριλαμβανομένων ημερομηνιών χημειοθεραπείας ή ακτινοβολίας)
 - Ημερομηνία και ώρα συλλογής του δείγματος
 - Ονοματεπώνυμο του ιατρού
 - Είδος δείγματος (μυελός των οστών ή CSF)

* Πληροφορίες (όπως μέτρηση WBC, διαφοροποίηση, μορφολογικά, κυτταροχημικά, μοριακά και κυτταρογενετικά ευρήματα) θα πρέπει να είναι διαθέσιμες

Σήμανση Δειγμάτων και Παραπτεμπτικό Εξέτασης Παλαιότητα Δείγματος

- Η παλαιότητα του δείγματος είναι μία σημαντική παράμετρος στην εξέταση (ανάλυση) με κυτταρομετρία ροής, γι' αυτό στα δείγματα θα πρέπει να αναγράφεται η ημερομηνία και ώρα της συλλογής.
- Τα δείγματα πρέπει να κατεργάζονται όσο το δυνατόν γρηγορότερα – ιδιαιτέρως σε περιπτώσεις κακοηθειών με υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού (π.χ. λέμφωμα Burkitt) ή σε ασθενείς που έχουν λάβει χημειοθεραπεία ή υποστεί ακτινοβολία
- Απαίτηση ορίου 48 ωρών από τη λήψη του δείγματος – όχι απόρριψη **αναντικατάστατων** δειγμάτων εάν ξεπεραστεί το όριο των 48 ωρών αλλά προσπάθεια εξαγωγής χρήσιμων πληροφοριών
- Αναφορά για την υπέρβαση παλαιότητας του δείγματος στην απάντηση της εξέτασης
- Ορισμένα αντιγόνα είναι περισσότερο ασταθή (π.χ. CD138 και CD16) και μπορεί να επηρεαστούν με την αυξανόμενη παλαιότητα του δείγματος
 - Ενδεχόμενη ύπαρξη ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων των ασταθών αντιγόνων σε δείγματα μεγάλης παλαιότητας

Σήμανση Δειγμάτων και Παραπαραπτικό Εξέτασης Σήμανση μολυσματικών δειγμάτων

- Σήμανση των δειγμάτων σύμφωνα με τα διεθνή ή εθνικά πρότυπα ασφαλείας
- Όλα τα δείγματα θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά μολυσματικά και να ακολουθούνται τα διεθνή μέτρα προφύλαξης

Τεχνικές Συλλογής Δείγματος

- Ιστοί και σωματικά υγρά (π.χ. περιφερικό αίμα, μυελός των οστών, πλευριτικό και ασκитικό υγρό ή ENY) θεωρούνται δυνητικά μολυσματικά και πρέπει να ακολουθούνται μέτρα βιοασφάλειας κατά τη διάρκεια της συλλογής και χειρισμού των σωματικών υγρών
 - Οι ιστοί και τα υγρά δεν μπορούν να μονιμοποιηθούν με φορμαλδεΰδη ή άλλα μονιμοποιητικά, ενώ θα πρέπει να μεταφερθούν στο εργαστήριο το συντομότερο δυνατό – γενικά θα πρέπει να παρέχονται νωπά δείγματα για ανάλυση στο εργαστήριο
 - Η επιλογή του αντιπηκτικού διαφέρει ανάλογα με το είδος του δείγματος
 - Αποφυγή ακραίων θερμοκρασιών
- * Most current edition of CLSI/NCCLS document H3 – *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture*

Τεχνικές Συλλογής Δείγματος Μυελός των Οστών - Αναρρόφηση και Βιοψία

- Συλλογή δείγματος με βάση την καθιερωμένη ιατρική τεχνική για αναρρόφηση του μυελού των οστών
- Στην περίπτωση αναρρόφησης μυελού των οστών “dry tap”, δείγμα οστεομυελικής βιοψίας μπορεί να σταλεί για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής
- Κατά τη διενέργεια πολλαπλών αναρροφήσεων (π.χ. για μορφολογία, ΚΡ, κυτταρογενετικά), η δεύτερη και τρίτη αναρρόφηση συχνά περιέχει μεγάλη ποσότητα αίματος – τα δείγματα θα πρέπει να τεθούν σε σειρά προτεραιότητας
- Σχόλιο για πιθανή πρόσμειξη αίματος στο μυελό πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στην απάντηση της εξέτασης

Τεχνικές Συλλογής Δείγματος Άλλα Σωματικά Υγρά

- Πολλά άλλα ειδών δειγμάτων είναι εργαστηριακά χρήσιμα στην αξιολόγηση ασθενών με νεοπλασματικές ασθένειες (πλευριτικό υγρό, ασκитικό υγρό και ENY)
- Συλλογή των παραπάνω δειγμάτων σύμφωνα με την καθιερωμένη ιατρική τεχνική.
- Ο χειρισμός των δειγμάτων μετά την παραλαβή τους από το εργαστήριο θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τα διεθνή μέτρα προφύλαξης

Τεχνικές Συλλογής Δείγματος Δείγματα Ιστών

- Δείγμα λεμφαδένα, σπλήνα, αναρροφήσεις συμπαγών οργάνων και άλλων χειρουργικών και/ή δειγμάτων βιοψίας μπορεί να υποβληθούν για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής
- Συλλογή των παραπάνω δειγμάτων σύμφωνα με την καθιερωμένη ιατρική τεχνική
- Τα νωπά (π.χ. μη μονιμοποιημένα ή χημικώς διατηρούμενα) δείγματα ιστών θα πρέπει να τοποθετηθούν σε θρεπτικό μέσο μεταφοράς (εξωτερική μεταφορά) ή σε αποστειρωμένη εμποτισμένη με φυσιολογικό ορό γάζα (εσωτερική μεταφορά) τη στιγμή λήψης τους, ώστε να διατηρηθούν μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο

Αντιπηκτικά

- Η επιλογή του αντιπηκτικού εξαρτάται από:
 - Είδος δείγματος
 - Μεταφορά δείγματος
 - Απαιτήσεις αποθήκευσης
 - Μέθοδο προετοιμασίας του δείγματος (σε ορισμένες περιπτώσεις)

Αντιπηκτικά σε δείγματα Αίματος

- EDTA (Ethylene-diaminetetraacetic acid), ACD (acid citrate dextrose, solution A) ή ηπαρίνη (200U/mL) μπορεί να χρησιμοποιηθούν – αντιπηκτικό επιλογής: EDTA (2mg/mL K_2EDTA), εάν ο προσδιορισμός WBC και διαφοροποίησης του λευκοκυτταρικού τύπου γίνεται από το ίδιο δείγμα που θα χρησιμοποιηθεί στην ΚΡ
- Σταθερότητα δειγμάτων με:
 - ACD: 72 ώρες
 - Ηπαρίνη: 48-72 ώρες
 - EDTA: 12-24 ώρες
- * Δείγματα με EDTA άνω των 24 ωρών θεωρούνται μη αξιόπιστα (suboptimal), εφόσον θα έχουν μειωθεί τα κοκκιοκύτταρα (λόγω ταχείας νέκρωσης κοκκιοκυττάρων)
- Δείγματα που περιέχουν αντιπηκτικό εκτός του EDTA θα πρέπει να συνοδεύονται από ένα επίχρισμα περιφερικού αίματος χωρίς χρώση για μορφολογική εξέταση

Αντιπηκτικά σε δείγματα Αίματος (2)

Το **EDTA** που είναι ένας χημικός παράγοντας είναι ιδιαίτερα χρήσιμο αντιδραστήριο στις αιματολογικές εξετάσεις διότι προστατεύει τα κυτταρικά συστατικά του αίματος (μείωση ύπαρξης συσσωματωμάτων λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων)

Η **ηπαρίνη** είναι το πλέον διαδεδομένο αντιθρομβωτικό και προξενεί τη μικρότερη παρεμβολή στους προσδιορισμούς των διαφόρων παραμέτρων εκτός εκείνης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Το EDTA δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί, όταν το δείγμα πρόκειται να υποβληθεί σε λειτουργικές δοκιμασίες, διότι δεσμεύεται το Ca^{2+} . Το κατάλληλο αντιπηκτικό για τις λειτουργικές δοκιμασίες είναι η ηπαρίνη.

Αντιπηκτικά για δείγμα Μυελού των Οστών

- Αντιπηκτικό επιλογής για δείγματα μυελού των οστών θεωρείται η ηπαρίνη
- Αντιπηκτικό ACD δεν συστήνεται για δείγματα μυελού των οστών, αφού η αναλογία του δείγματος με το αντιπηκτικό δεν είναι η βέλτιστη τροποποιώντας το pH και επομένως μειώνοντας την βιωσιμότητα των κυττάρων
- Αντιπηκτικό K_2EDTA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη συλλογή δείγματος μυελού των οστών για αξιολόγηση με κυτταρομετρία ροής ή ανάλυση, όμως, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί εντός 12-24 ωρών
- Αντιπηκτικό ηπαρίνης απαιτείται εάν το δείγμα θα χρησιμοποιηθεί για κυτταρογενετική ανάλυση

Αντιπηκτικά Άλλων Σωματικών Υγρών και Ιστών

- Όταν κρίνεται απαραίτητο, τα αντιπηκτικά ηπαρίνη, EDTA και ACD για δείγματα σωματικών υγρών είναι κατάλληλα, αν και τα δείγματα που διατηρούνται σε ACD για την επόμενη ημέρα μπορεί να δείξουν χαμηλή βιωσιμότητα.
 - ** Εάν χρησιμοποιηθεί ACD, η κατάλληλη αναλογία σωματικού υγρού με αντιπηκτικό θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μην τροποποιηθεί το pH και επομένως μειώσει την βιωσιμότητα.
 - Όχι χρήση αντιπηκτικών στη συλλογή CSF.
 - Όχι χρήση αντιπηκτικών σε δείγματα ιστών.
- * Most current edition of CLSI document H56 – *Body Fluid Analysis for Cellular Composition*

ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Χειρισμός Δείγματος και Συσκευασία

- Όλα τα δείγματα πρέπει να θεωρούνται μολυσματικά και να χειρίζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος μόλυνσης για τους εργαζόμενους στο εργαστήριο και αυτούς που μεταφέρουν δείγματα
- Διαδικασίες χειρισμού, συσκευασίας, σήμανσης μεταφοράς δειγμάτων πρέπει να ακολουθούνται σύμφωνα με το UN 602 (United Nations Security Council resolution 602):
 - Τοποθέτηση δείγματος σε σωληνάρια ή φιάλες (κατά προτίμηση άθραυστα) μέσα σε ένα δεύτερο δοχείο ανθεκτικό σε διαρροές με αρκετό απορροφητικό υλικό ώστε να απορροφήσει ολόκληρο το περιεχόμενο της φιάλης, εάν αυτή σπάσει
 - Προσεκτική κάλυψη ή συσκευασία των γυάλινων τμημάτων, ώστε να εξαφανιστούν οι αιχμηρές άκρες και γωνίες
 - Το δεύτερο δοχείο θα πρέπει να έχει αρκετή μονωτική ικανότητα ώστε να διατηρεί τη θερμοκρασία μεταφοράς σε θερμοκρασία δωματίου (18-22°C)
 - Μονωτικά δοχεία πάχους μιας ίντσας είναι συνήθως κατάλληλα για αυτό τον σκοπό

Ακεραιότητα Δειγμάτων

- Οι διαδικασίες χειρισμού και μεταφοράς των δειγμάτων θα πρέπει να διατηρούν τη βιωσιμότητά τους
- Η ακεραιότητα των δειγμάτων είναι απόρροια των:
 1. Αντιπηκτικό
 2. Συνθήκες αποθήκευσης (χρόνος και θερμοκρασία)
 3. Τεχνική προετοιμασίας του δείγματος
- ❖ Αποθήκευση στους 4°C μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη για παρατεταμένη αποθήκευση ορισμένων δειγμάτων (όπως πλευριτικού υγρού και εναιωρημάτων κυττάρων από ιστούς)
- ❖ Αποφυγή ακραίων θερμοκρασιών

Ακεραιότητα Δειγμάτων (2)

- Τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία δωματίου (18-22°C) εάν υποστούν επεξεργασία και μονιμοποιηθούν για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής άμεσα μετά τη συλλογή τους
- Δείγματα αίματος μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία δωματίου (18-22°C) μέχρι 72 ώρες
τα δείγματα είναι σταθερά μέχρι 72 ώρες με αντιπηκτικό ηπαρίνη ή ACD και μέχρι 24 ώρες με EDTA ,
η ποιότητα του δείγματος μπορεί να ελαττωθεί πέραν αυτών των ωρών
- Δείγματα μυελού των οστών (με αντιπηκτικό ηπαρίνη) μπορεί να διατηρηθούν σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες
- Φρέσκα δείγματα ιστών θα πρέπει να τοποθετηθούν σε θρεπτικό μέσο μεταφοράς ή σε αποστειρωμένη γάζα εμποτισμένη με στείρο φυσιολογικό ορό την στιγμή λήψης τους, ώστε να διατηρηθούν μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο

Εάν το δείγμα παραμείνει για αρκετό χρονικό διάστημα (χωρίς να υποστεί επεξεργασία), η βιωσιμότητα μπορεί να ελαττωθεί εάν το καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο των ιστών δεν χρησιμοποιείται ως θρεπτικό μέσο μεταφοράς.

Με τη χρήση καλλιεργητικού θρεπτικού μέσου μπορεί να αυξηθεί ο αυτοφθορισμός των ιστών
Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η χαμηλή βιωσιμότητα σε σχέση με τον αυτοφθορισμό όταν επιλέγεται το θρεπτικό μέσο μεταφοράς

Ακεραιότητα Δειγμάτων (3)

- Πολλά εργαστήρια διεξάγουν ανοσοφαινότυπο αιματολογικών νοσημάτων σε δείγματα που έχουν μεταφερθεί από μακριά– Είναι πολύ σημαντικό το δείγμα να μεταφέρεται στο εργαστήριο το συντομότερο δυνατό προς ελαχιστοποίηση της απώλειας κυττάρων
- Δεν προτείνεται να κρατούνται νωποί ιστοί για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής μέχρι την ετοιμασία των ιστολογικών εξετάσεων, αφού αυτή η καθυστέρηση μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την βιωσιμότητα του δείγματος
- Χημειοθεραπεία και/ή θεραπεία με ακτινοβολία μπορεί επίσης να επηρεάσει σημαντικά την ανάκτηση των κυττάρων
- Όταν η ανάλυση του δείγματος καθυστερεί λόγω μεταφοράς του σε απομακρυσμένο εργαστήριο είναι χρήσιμη η αποστολή και νωπού επιχρίσματος του δείγματος
 - Εναλλακτική είναι η προσθήκη ενός σταθεροποιητικού υγρού στο δείγμα, γεγονός που θα επιτρέψει την αποθήκευση του δείγματος μέχρι 10 ημέρες ώστε να πραγματοποιηθεί η ανάλυση
- ❖ Τα εργαστήρια θα πρέπει να αποδεικνύουν ότι στη συγκεκριμένη εφαρμογή τα αποθηκευμένα δείγματα δίνουν ισοδύναμα αποτελέσματα με εκείνα των φρέσκων δειγμάτων

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

ΣΤΟΧΟΣ: Η κατάλληλη επεξεργασία του δείγματος ασθενούς για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής

- Διατήρηση όλων των κυτταρικών και αντιγονικών χαρακτηριστικών (παραμέτρων) των λεμφοκυττάρων, των μονοκυττάρων και των μυελοκυττάρων
- Μη συναφή κύτταρα (π.χ. RBC) που μπορεί να επιβραδύνουν ή να εμποδίσουν την ανάλυση θα πρέπει να απομακρυνθούν
- Προσοχή στην αποφυγή απώλειας νεοπλασματικών κυττάρων όταν αποτελούν μειονότητα στο δείγμα
- ❖ Όσο περισσότερο επεξεργάζεται ένα εναιώρημα κυττάρων, τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα απώλειας κυττάρων
- ❖ Προτείνεται ως διαδικασία επιλογής μια μέθοδος χρώσης και λύσης ολικού αίματος χωρίς πλύσιμο (λόγω μειωμένης επεξεργασίας)

Οπτική Εξέταση

- Αναφορά μη φυσιολογικής εικόνας του δείγματος (π.χ. λιπαιμία) θα πρέπει να συμπεριληφθεί στην απάντηση της εξέτασης και να ληφθεί υπόψη κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, ανάλυσης και ερμηνείας των αποτελεσμάτων του δείγματος
- Τα παρατηρούμενα προβλήματα των δειγμάτων είναι δύο ειδών:
 1. Αυτά που υποδεικνύουν ότι το δείγμα είναι αλλοιωμένο ή κατεστραμμένο – γεγονός που απαιτεί την άμεση απόρριψη του δείγματος (εκτός και αν το δείγμα είναι αναντικατάστατο)
 2. Αυτά που υποδεικνύουν ότι συνέβη λανθασμένη επεξεργασία του δείγματος – γεγονός που απαιτεί περαιτέρω εκτίμηση κατά τη διάρκεια προετοιμασίας του δείγματος.
- ❖ Προβλήματα λανθασμένης επεξεργασίας δειγμάτων θα πρέπει να καταγραφούν, γιατί μπορεί να δώσουν πληροφορίες κατά την προετοιμασία, ανάλυση και ερμηνεία των δεδομένων του δείγματος

Αιμόλυση

- Η αιμόλυση μπορεί να υποδείξει την έκθεση του αίματος σε συνθήκες που προκαλούν λύση των RBC, κάτι που υποδηλώνει ότι τα WBC μπορεί επίσης να έχουν καταστραφεί και διαφοροποιηθεί ανοσοφαινοτυπικά.
Προτείνεται η απόρριψη των αιμολυμένων δειγμάτων
- ❖ Προσοχή στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων παρουσία αιμόλυσης

Πήγματα Αίματος

- Ακόμη και ένα μικρό πήγμα αίματος μπορεί να προκαλέσει απώλεια ή διαφοροποίηση ορισμένων υποπληθυσμών
- Τα δείγματα παρουσία πηγμάτων αίματος δεν αντικατοπτρίζουν την *in vivo* κατάσταση
- Ακόμη και αν το εργαστήριο διαγνώσει μία ασθένεια, μπορεί να υπάρχει και μία δεύτερη η οποία να μην διαγνωστεί
- ❖ Δείγματα με πήγματα αίματος πρέπει να απορρίπτονται εκτός και αν είναι αναντικατάστατα, που στην περίπτωση αυτή πρέπει να γίνει οποιαδήποτε προσπάθεια απόκτησης χρήσιμης πληροφορίας – το πήγμα αίματος μπορεί να απομακρυνθεί και τα κύτταρα να ληφθούν από το πήγμα αίματος και να φιλτραριστούν
- ❖ Πρέπει να σημειωθεί στην απάντηση της εξέτασης ότι τα αποτελέσματα μπορεί να επηρεάζονται παρουσία πηγματος αίματος στο δείγμα

Μικρός Όγκος Δειγμάτων

- Για ορισμένα αντιπηκτικά (π.χ. ACD), ένα μερικώς γεμάτο σωληνάριο μπορεί να δημιουργήσει υπερτονικές συνθήκες, οι οποίες είναι καταστρεπτικές για τα κύτταρα
- ❖ Ανάλογα με την αναλογία δείγματος: αντιπηκτικό το εργαστήριο μπορεί να δεχθεί ή να απορρίψει το δείγμα
- Αν το δείγμα γίνει αποδεκτό, το εργαστήριο θα πρέπει να έχει αποδείξει προηγουμένως ότι η αλλαγή αναλογίας δείγματος : αντιπηκτικού δεν επηρεάζει τα τελικά αποτελέσματα και θα πρέπει η αλλαγή αυτή να λαμβάνεται υπόψη κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας, ανάλυσης και ερμηνείας των αποτελεσμάτων
- ❖ Μικροί όγκοι δείγματος, όπως μυελού οστών που λαμβάνονται από τα παιδιά μπορεί να στεγνώσουν αν δεν γίνει άμεση διάλυση σε ισοτονικό διάλυμα

Ακραίες Θερμοκρασίες

- Εάν το σωληνάριο του δείγματος που στάλθηκε στο εργαστήριο, μπορεί να έχει εκτεθεί σε ακραίες θερμοκρασίες η εξέταση κατόπιν αγγίγματος (εάν το δείγμα είναι ασυνήθιστα ζεστό ή κρύο) δεν είναι επαρκής
- Για όλες τις μεταφορές (εκτός αυτών της ίδιας ημέρας) συστήνεται να περιλαμβάνεται στην συσκευασία ένας αισθητήρας ελάχιστης-μέγιστης θερμοκρασίας, ώστε να καταγράφεται τυχόν ύπαρξη ή μη ακραίων θερμοκρασιών κατά τη διάρκεια της μεταφοράς
- ❖ Ακόμη και εάν όλα τα υπόλοιπα κριτήρια αξιολόγησης είναι ικανοποιητικά, αυτή η παρατήρηση θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας, ανάλυσης και ερμηνείας των αποτελεσμάτων

Ακατάλληλη Σήμανση Δειγμάτων

- Όλα τα δείγματα θα πρέπει να σημαίνονται άμεσα με τα στοιχεία του ασθενούς και την ημερομηνία και ώρα της συλλογής τους (όπως έχει ήδη αναφερθεί)
- Εάν κάποιο δείγμα δεν έχει τα παραπάνω στοιχεία, τότε το εργαστήριο θα πρέπει να ακολουθήσει τους καθιερωμένους κανόνες που αφορούν τα μη επισημασμένα δείγματα και εάν δεν υπάρξει επαρκής ταυτοποίηση του δείγματος, τότε θα πρέπει να απορριφθεί

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΦΑΣΗ

ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Προκειμένου να μετρηθεί ένα δείγμα με κυτταρομετρία ροής (περιφερικό αίμα, μυελός οστών, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, πλευριτικό υγρό, ασκитικό υγρό, βρογχοκυψελιδικό υγρό, ιστός) πρέπει να βρίσκεται υπό τη μορφή εναιωρήματος
- Όσο περισσότερο κατεργάζεται ένα εναιώρημα κυττάρων τόσο πιο πιθανή είναι η απώλεια κυττάρων
- Προτιμώμενη μέθοδος: Χρώση και λύση ολικού αίματος χωρίς πλύσιμο (πλεονεκτεί αφού περιλαμβάνει ελάχιστη επεξεργασία δείγματος)
- Θεωρείται ότι σε μια διαδικασία λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων όλοι οι υποπληθυσμοί των WBC είναι εξίσου ανθεκτικοί στην χρησιμοποιούμενη μέθοδο λύσης. Αυτό, μπορεί να μην ισχύει στην περίπτωση δειγμάτων μυελού των οστών ή αίματος ασθενών με αιματολογική νεοπλασία
- ❖ Έχει δειχθεί ότι οι υποπληθυσμοί των WBC φυσιολογικού δείγματος είναι περισσότερο ευπαθείς στην διαδικασία λύσης από άλλους και ότι διαφορετικά αντιδραστήρια λύσης έχουν διαφορετικά αποτελέσματα
- ❖ Σε ορισμένα δείγματα είναι προτιμότερο να γίνει χρώση των κυτταροπλασματικών αντιγόνων που απαιτεί στάδιο αύξησης διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης πριν την επιφανειακή χρώση

ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (2)

Σημαντικές παράμετροι:

- ποσότητα δείγματος
- Ποσότητα/συγκέντρωση μονοκλωνικού αντισώματος
- Αντιδραστήριο λύσης
- Αντιδραστήριο μονιμοποίησης
- Αντιδραστήριο αύξησης διαπερατότητας κυτταρικής μεμβράνης
- Χρόνος επώασης/ χρόνος λύσης
- Αριθμός στροφών φυγόκεντρου
- Χρόνος φυγοκέντρωσης

ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

- Οι προτεινόμενες από την κατασκευάστρια εταιρεία ποσότητες των αντισωμάτων συνήθως αναφέρονται στο σύνηθες εύρος του αριθμού των επισημασμένων κυττάρων-στόχων
- Σύνηθες εύρος WBC κυμαίνεται μεταξύ $0,2 - 2 \times 10^6$ εμπύρηνα κύτταρα ανά σωληνάριο
- Οι προτεινόμενες ποσότητες των αντισωμάτων μπορεί να είναι μη επαρκείς για την σήμανση όλων των περιοχών σύνδεσης σε πυκνά δείγματα κυττάρων, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα
- Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να διαθέτει μία διαδικασία ταυτοποίησης δειγμάτων με μη φυσιολογικό εύρος αριθμών κυττάρων και να επεμβαίνει ώστε σε κάθε σωληνάριο να υπάρχει συνολικός αριθμός $0,2 - 2 \times 10^6$ κυττάρων-στόχων ή σύμφωνα με τις συστάσεις της κατασκευάστριας εταιρείας
- ❖ Σε περιπτώσεις ανίχνευσης ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου, συνήθως απαιτούνται μεγαλύτεροι όγκοι δείγματος ενώ η συγκέντρωση του αντισώματος θα πρέπει να προσαρμοστεί ώστε να υπάρχει η κατάλληλη συγκέντρωση

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ

Η διαδικασία επιφανειακής χρώσης των δειγμάτων περιλαμβάνει:

- (1) Προσθήκη δείγματος/ Αντιδραστήριο λύσης/ Επώαση/ Πλύση/ Προσθήκη μονοκλωνικών αντισωμάτων/ Επώαση/ Μέτρηση
ή
- (2) Προσθήκη δείγματος/ Προσθήκη μονοκλωνικών αντισωμάτων/ Επώαση/ Αντιδραστήριο λύσης/ Επώαση/ Μέτρηση

ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΛΥΣΗΣ

- Υπάρχουν αρκετά εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια λύσης:
 - Νερό
 - Χλωριούχο αμμώνιο
 - Υποτονικό διάλυμα
- ❖ Όταν χρησιμοποιούνται μη μονιμοποιητικά αντιδραστήρια λύσης (π.χ. χλωριούχο αμμώνιο), τα σημασμένα (με μονοκλωνικό και φθορίζουσα ουσία) δείγματα θα πρέπει να φυλάσσονται σε πάγο και η ανάλυσή τους με ΚΡ να διενεργείται μέσα σε μία ώρα από την προετοιμασία τους (λόγω μείωσης της βιωσιμότητας)
- Όταν χρησιμοποιούνται εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια, θα πρέπει να ακολουθείται το συνιστώμενο πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας, εκτός και αν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα που επιβεβαιώνουν ότι οποιεσδήποτε τροποποιήσεις δεν επηρεάζουν δυσμενώς τα αποτελέσματα

ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Η ανίχνευση συγκεκριμένων ενδοκυττάρων αντιγόνων είναι σημαντική σε ορισμένες περιπτώσεις λευχαιμιών και λεμφωμάτων
- Η ενδοκυττάρια προετοιμασία των δειγμάτων περιλαμβάνει:
 1. Μονιμοποίηση των κυττάρων ώστε να διατηρήσουν την δομική τους ακεραιότητα
(Αντιδραστήριο μονιμοποίησης/Ανάδευση/Επώαση/Πλύση)
 2. Αύξηση διαπερατότητας των κυττάρων ώστε να επιτραπεί η είσοδος του μονοκλωνικού αντισώματος στο κύτταρο και να προσδεθεί στο αντίστοιχο αντιγόνο
(Αντιδραστήριο αύξησης διαπερατότητας κυτταρικής μεμβράνης/ Ανάδευση/Επώαση/Πλύση)
 3. Κυτταροπλασματική χρώση
(Προσθήκη μονοκλωνικών αντισωμάτων/ Ανάδευση/ Επώαση/Πλύση)

Επιλογή Αντιδραστηρίων Διαπερατότητας

- Υπάρχουν αρκετά εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια διαπερατότητας
- Όταν χρησιμοποιούνται εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια, θα πρέπει να ακολουθείται το προτεινόμενο πρωτόκολλο από την κατασκευάστρια εταιρεία, εκτός και αν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα που επιβεβαιώνουν ότι οποιεσδήποτε τροποποιήσεις δεν επηρεάζουν δυσμενώς τα αποτελέσματα
- Η επιλογή των αντιδραστηρίων διαπερατότητας μπορεί να εξαρτάται από το μελετώμενο αντιγόνο και τη φθορίζουσα ουσία με την οποία είναι συνδεδεμένο το αντίσωμα

ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- ❖ Εάν είναι σημαντικό να καθοριστεί ότι το αντιγόνο είναι αποκλειστικά ενδοκυττάριο, πρέπει να χρησιμοποιηθούν συγκεκριμένες μέθοδοι:
- ❖ Ταυτόχρονη χρώση με τον επιφανειακό και ενδοκυττάριο δείκτη χρησιμοποιώντας ξεχωριστά σωληνάρια
- ❖ Το κλάσμα του επιφανειακού δείκτη πρέπει να είναι αρνητικό ενώ το κλάσμα του ενδοκυτταρίου δείκτη θα πρέπει να είναι θετικό, ώστε να αποδειχθεί ότι το αντιγόνο είναι αποκλειστικά ενδοκυττάριο
- ❖ Σε ορισμένες περιπτώσεις όπου είναι διαθέσιμη περιορισμένη ποσότητα δείγματος, υπάρχει η δυνατότητα επιφανειακής χρώσης πριν την αύξηση διαπερατότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και ενδοκυτταρίας χρώσης μετά τη διαπερατότητα, χρησιμοποιώντας διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες
- ❖ Η επιφανειακή χρώση θα πρέπει να είναι αρνητική για τα ενδοκυττάρια αντιγόνα

ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (2)

- Όταν υπάρχει ανάγκη ταυτόχρονης χρώσης επιφανειακών δεικτών και ενός ενδοκυττάριου δείκτη (π.χ. CD33 και μυελοϋπεροξειδάση):
 1. Προηγείται η χρώση των επιφανειακών δεικτών
 2. Μονιμοποίηση
 3. Διαπερατότητα
 4. Ενδοκυττάρια χρώση
- ❖ Είναι σημαντικό η φθορίζουσα ουσία του επιφανειακού δείκτη να μην επηρεάζεται από την επακόλουθη μονιμοποίηση και διαπερατότητα
- ❖ Ορισμένες φορές είναι πιθανό να γίνεται ταυτόχρονη χρώση των επιφανειακών και ενδοκυττάριων δεικτών μετά την αύξηση διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης όπου είναι σημαντικό ο επιφανειακός επίτοπος να διατηρείται κατά τη διαδικασία της μονιμοποίησης και της αύξησης της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης

ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (3)

- ❖ Στην ενδοκυττάρια χρώση, η φθορίζουσα ουσία θα πρέπει να είναι αρκετά μικρή σε μέγεθος ώστε να εισέλθει στο κύτταρο στο στάδιο της διαπερατότητας. Βέβαια, η προσεκτική επιλογή του αντιδραστηρίου διαπερατότητας μπορεί να επιτρέψει την χρώση με οποιαδήποτε φθορίζουσα ουσία
- ❖ Το στάδιο του πλυσίματος είναι ιδιαίτερος σημαντικό στην ενδοκυττάρια χρώση, αφού απομακρύνει:
 1. Μονιμοποιητικό
 2. Υπολειπόμενο αντιδραστήριο διαπερατότητας
 3. Μη-συνδεδεμένο αντίσωμα συζευγμένο με φθορίζουσα ουσία
- ❖ Αποφυγή μη-ειδικών αποτελεσμάτων με τιτλοποίηση του αντισώματος όταν πραγματοποιείται ενδοκυττάρια χρώση (έρευνες τιτλοποίησης και επικύρωσης της ενδοκυττάριας χρώσης θα πρέπει να καταγράφονται)

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

- Σε κάθε δείγμα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά την ανάλυση
- Ιδανική η χρώση των κυττάρων με τα μονοκλωνικά αντισώματα όταν η κυτταρική δομή διατηρείται στην αρχική της κατάσταση κατά τη διάρκεια της ανάλυσης
- Η κυτταρική δομή αλλοιώνεται όταν από τη συλλογή μέχρι την ανάλυση του δείγματος τροποποιούνται το pH, οι συνθήκες αποθήκευσης και ο τρόπος κατεργασίας του δείγματος
- Στα νεκρά κύτταρα μπορεί να προσδένονται μη-ειδικά αρκετά αντισώματα και να παρεμβάλλονται στην σωστή ανοσοφαινοτυπική ανάλυση
- Είναι σημαντικό να καθοριστεί η βιωσιμότητα του υποβληθέντος δείγματος (ιδιαίτερα σημαντικό σε δείγματα νωπών ιστών)
- ❖ Εκτίμηση της βιωσιμότητας θα πρέπει να πραγματοποιείται σε όλα τα υποβληθέντα δείγματα ιστών για ανάλυση με KP, καθώς επίσης και σε δείγματα αίματος ή μυελού των οστών που λαμβάνονται μετά από 48 ώρες από την στιγμή της συλλογής

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (2)

- ❖ Άλλες καταστάσεις όπου προτείνεται η ανάγκη αξιολόγησης της βιωσιμότητας είναι:
 - Καθυστέρηση ανοσοφαινοτυπικής ανάλυσης λόγω μεταφοράς ή άλλων περιστάσεων
 - Ύπαρξη αμφιβολίας τρόπου επεξεργασίας του δείγματος
 - Όταν ο ασθενής υφίσταται χημειοθεραπεία ή θεραπεία με ακτινοβολία, κάτι που καθιστά τα κύτταρα πιο ευπαθή
 - Σε δείγματα ιστών
 - Πιθανή ύπαρξη κακοήθους νόσου υψηλής πολλαπλασιαστικής ικανότητας

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

- Η αξιολόγηση της βιωσιμότητας μπορεί να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονα με την αξιολόγηση των επισημασμένων κυττάρων με ΚΡ ή με χειροκίνητες μεθόδους πριν την επισήμανση των κυττάρων
- Διερεύνηση βιωσιμότητας σε “real-time” μπορεί να επιτευχθεί με χρήση φθορίζουσών χρωστικών [ιωδιούχο προπύδιο (PI), 7'αμινο'ακτινομυκίνη D (7-ADD), μονοαζίδιο αιθιδίου] που προσδένονται στο DNA, αλλά και άλλων νεότερων δεικτών.
- Ρήξεις στην κυτταρική μεμβράνη των νεκρών κυττάρων θα επιτρέψουν την χρώση. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιούνται μη μονιμοποιημένα δείγματα, αφού το PI ή το 7-AAD μπορούν να συνδεθούν σε όλα τα κύτταρα μετά την μονιμοποίηση και την αποθήκευση του δείγματος
- Εάν χρησιμοποιηθούν δείκτες βιωσιμότητας για διάκριση βιωσιμότητας σε μονιμοποιημένα δείγματα, το εργαστήριο θα πρέπει να επαληθεύσει τη μέθοδο, χρησιμοποιώντας αντιπροσωπευτικά δείγματα ασθενών, ότι οι συγκεκριμένοι δείκτες δίνουν ανάλογα αποτελέσματα με εκείνα των καθιερωμένων χρωστικών βιωσιμότητας (π.χ. PI, 7-AAD, trypan blue) σε μη μονιμοποιημένα δείγματα

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (2)

- ❖ Οποιαδήποτε μέθοδος και αν χρησιμοποιηθεί, το εργαστήριο είναι υπεύθυνο για τον καθορισμό της συγκέντρωσης της χρωστικής βιωσιμότητας που θα χρησιμοποιηθεί ώστε να γίνει η καλύτερη διάκριση μεταξύ των ζώντων και των νεκρών κυττάρων
- ❖ Εάν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με μονοκλωνικά αντισώματα προσδεδεμένα σε άλλες φθορίζουσες χρωστικές, τα νεκρά κύτταρα μπορούν να αφαιρεθούν από την ανάλυση με κατάλληλες οριοθετήσεις (gating), ενώ η αξιολόγηση των επιφανειακών δεικτών θα αφορά μόνο στα ζώντα κύτταρα
- Καμία διαδικασία δεν διακρίνει αν τα νεκρά κύτταρα είναι αποκλειστικά τα κύτταρα ενδιαφέροντος ή τυχαία απώλεια κυττάρων

Αναφορά Δειγμάτων Χαμηλής Βιωσιμότητας

- ❖ Όχι απόρριψη δειγμάτων μόνο εξαιτίας της χαμηλής βιωσιμότητας
 - Τα δείγματα ιστών έχουν συχνά χαμηλότερη βιωσιμότητα από τα υγρά δείγματα
 - Η ανάκτηση των κυττάρων και η βιωσιμότητα είναι συχνά χαμηλότερες σε επιθετικούς όγκους (με ύπαρξη μεγάλου αριθμού κυττάρων σε σχέση με ύπαρξη μικρού αριθμού κυττάρων σε νοσήματα καλής πρόγνωσης), ενώ τα μεγάλα νεοπλασματικά κύτταρα είναι περισσότερο ευπαθή κατά την επεξεργασία του δείγματος
- ❖ Δεν υπάρχει κάποιος κανόνας που να καθορίζει ένα όριο (cut-off) βιωσιμότητας (ένα δείγμα χαμηλής βιωσιμότητας που αποτελείται από νεοπλασματικά κύτταρα μπορεί να δώσει αξιόλογα αποτελέσματα)
- Οι κατευθυντήριες οδηγίες υποδεικνύουν:
 - Απόρριψη δειγμάτων με βιωσιμότητα $<75\%$, εάν το δείγμα δεν είναι αναντικατάστατο (**Προσοχή! ΒΜ ή ιστός αναντικατάστατα δείγματα**)
 - Εάν είναι αναντικατάστατο και έχει ζωντανά κύτταρα $<75\%$, δημιουργία έκθεσης όπου αναφέρεται η χαμηλή βιωσιμότητα κυττάρων και η ταυτοποίηση παθολογικών πληθυσμών
 - Εάν δεν ταυτοποιούνται παθολογικοί πληθυσμοί και η βιωσιμότητα είναι $<75\%$, γίνεται απόρριψη και αναζήτηση νέου δείγματος

Αναφορά Δειγμάτων Χαμηλής Βιωσιμότητας (2)

- Η απόφαση απόρριψης θα πρέπει να ληφθεί από τον υπεύθυνο εργαστηρίου σε σχέση με άλλα κλινικά και τεχνικά γνωρίσματα της περίπτωσης
- Σημαντική η μέγιστη δυνατή βιωσιμότητα σε ειδικά δείγματα, ομφαλοπλακουντιακό, αποψυγμένα δείγματα.
- Εάν δεν απορριφθεί, ένα σχόλιο στην απάντηση εξέτασης θα πρέπει να υποδεικνύει τις μη αξιόπιστες συνθήκες που πιθανά επηρεάζουν τα αποτελέσματα
- Σε δείγματα με χαμηλό αριθμό ζώντων κυττάρων, μη ταυτοποίηση μιας νεοπλασματικής διαδικασίας (ακόμη και χωρίς να ληφθούν υπόψη τα νεκρά κύτταρα) δεν πρέπει να θεωρηθεί ως αρνητικό αποτέλεσμα
- ❖ Εκτίμηση και σχόλιο αυτού του γεγονότος θα πρέπει να γίνει στην τελική απάντηση

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

❖ Χρήση Μονιμοποιητικού/Σταθεροποιητικού μέσου

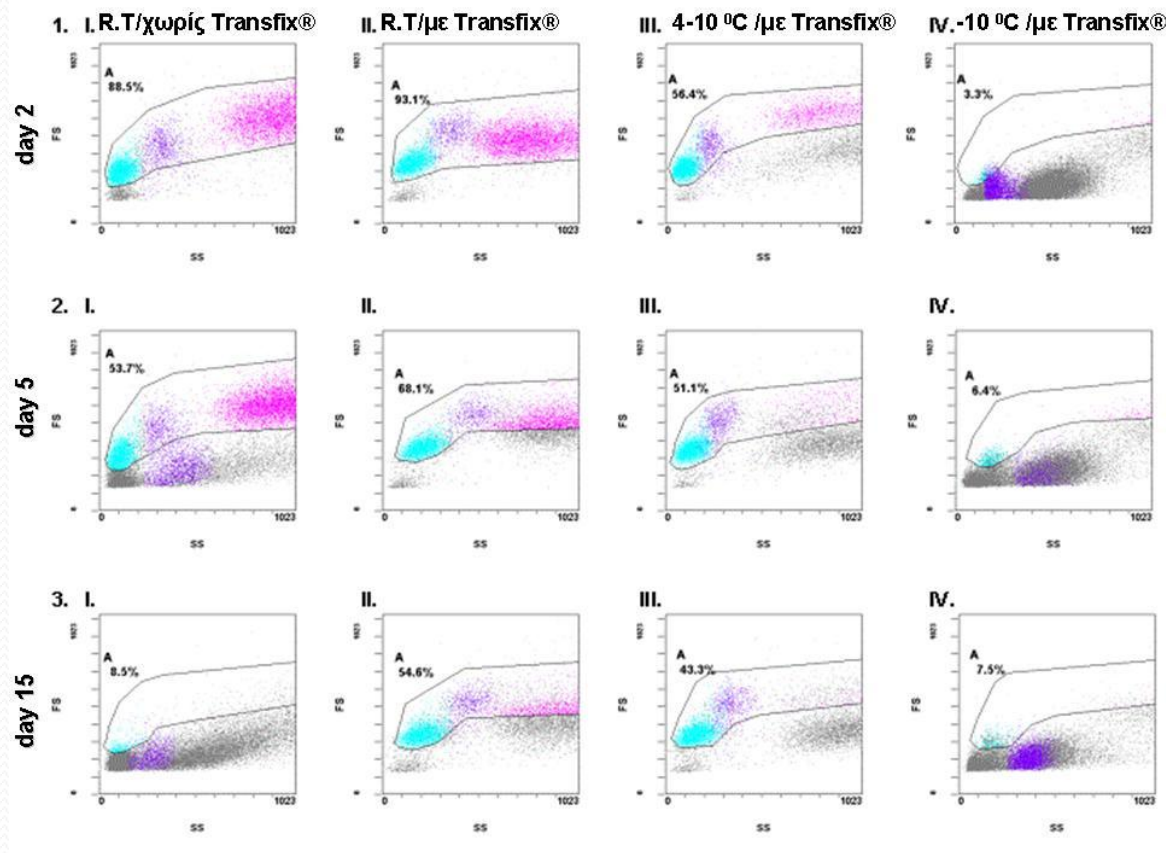
United Kingdom National External Quality Assessment Service (UK NEQAS)*:

«Το υλικό (για το πρόγραμμα ελέγχου τυποποίησης λευχαιμιών μέσω ανοσοφαινότυπου) διατηρείται εφαρμόζοντας διεθνώς αναγνωρισμένη μέθοδο που διατηρεί τη βιωσιμότητα και τα χαρακτηριστικά σκέδασης του φωτός και έντασης φθορισμού των λευκοκυττάρων (για τουλάχιστον 6 μήνες σε θερμοκρασία δωματίου και άνω των τριών ετών στους 4 °C)»

* www.ukneqasli.org

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (2)

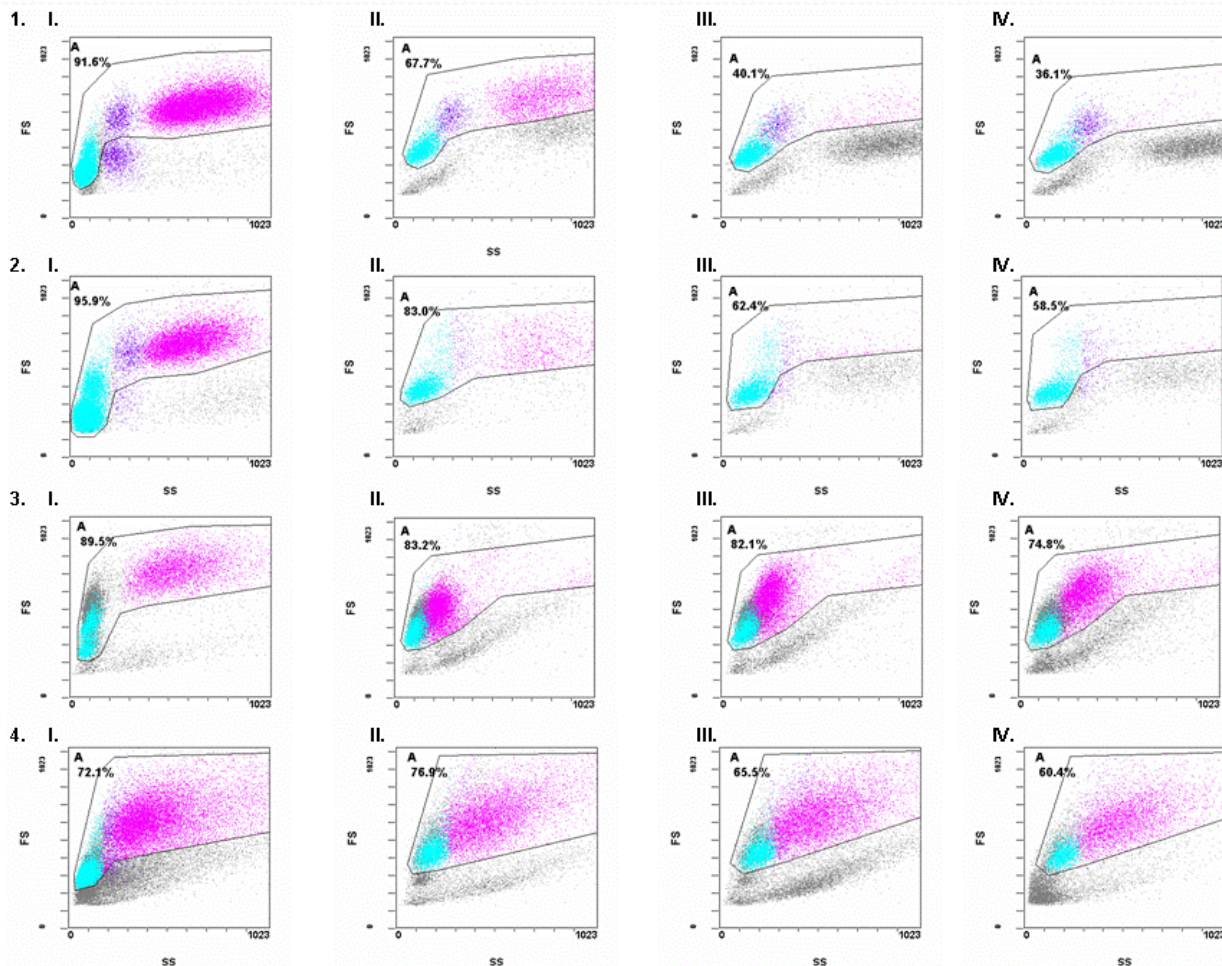
Η επίδραση του μονιμοποιητικού/συντηρητικού υλικού Transfix® στη βιωσιμότητα, τα χαρακτηριστικά σκέδασης και τα χαρακτηριστικά του αντιγονικού προφίλ των λευκοκυττάρων δειγμάτων περιφερικού αίματος και μυελού των οστών σε διάφορες συνθήκες.



Σχήμα 1: Χαρακτηριστικά σκέδασης του φωτός των ζώντων λευκοκυττάρων την ημέρα 2, 5, και 15, I. στο δείγμα χωρίς Transfix® που αποθηκεύτηκε στη R.T., II. στο δείγμα με Transfix® που αποθηκεύτηκε στη R.T., III. στο δείγμα με TransFix® που αποθηκεύτηκε στους 4-10°C και IV. στο δείγμα με Transfix® που αποθηκεύτηκε στους -10°C.

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (3)

Διερεύνηση διατήρησης βιωσιμότητας και χαρακτηριστικών λευκοκυττάρων σε δείγματα ασθενών με αιματολογικά νοσήματα παρουσία TRANSFIX®



Σχήμα 2: Οριοθέτηση ζώντων λευκοκυττάρων [που βασίζεται στο στικτόγραμμα FS=f(SSc)]: 1. PB ελέγχου, 2. PB B-CLL, 3. PB AML, και 4. BM MDS, την (I) ημέρα 1, (II) ημέρα 4, (III) ημέρα 7, και (IV) ημέρα 15.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΧΡΩΣΗ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

- Τα αντισώματα έναντι ανοσοσφαιρινών παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά μεταξύ των αντιδραστηρίων που συνήθως χρησιμοποιούνται στην κλινική ΚΡ εξαιτίας του ότι αντιδρούν με μία ουσία που βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στο πλάσμα του ασθενούς και σε άλλα σωματικά υγρά
- Ακολουθούνται ειδικές διαδικασίες προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι η τεχνική θα ανιχνεύσει ανοσοσφαιρίνη στην επιφάνεια των κυττάρων
- Πολλά είδη κυττάρων μπορούν να προσδέσουν μη-ειδικά ανοσοσφαιρίνη μέσω των Fc υποδοχέων, ενώ απαιτούνται αρκετά στάδια προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι η συνδεόμενη με το κύτταρο ανοσοσφαιρίνη είναι εγγενής και όχι εξωγενής

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΧΡΩΣΗ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ (2)

- Απαιτείται ικανοποιητικό πλύσιμο με διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS) πριν την χρώση με αντιδραστήρια έναντι ανοσοσφαιρινών ώστε να απομακρυνθεί υπολειπόμενο πλάσμα ή κυτταροπλασματικές ανοσοσφαιρίνες
- Αν και το πλύσιμο απομακρύνει αυτά τα αντισώματα στις περισσότερες περιπτώσεις, επώαση 30 λεπτών έως μιας ώρας στους 37°C και ξανά πλύσιμο δύο φορές ακόμα με φυσιολογικό ορό ή καλλιεργητικό μέσο ιστών είναι περισσότερο αποτελεσματικό και μπορεί να απαιτείται σε ορισμένες περιπτώσεις
- ❖ Αυτή η διαδικασία μπορεί επίσης να απομακρύνει και άλλα αντιγόνα, όπως το CD23

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΧΡΩΣΗ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ (3)

- Η παρεμπόδιση που οφείλεται στην κυτταροπλασματική ανοσοσφαιρίνη μπορεί (σε ορισμένες περιπτώσεις) να αντιμετωπιστεί από την κατάλληλη δημιουργία συνδυασμών (panels) αντισωμάτων
- ❖ Για παράδειγμα, τα Β-κύτταρα έχουν, γενικότερα, χαμηλότερα επίπεδα υποδοχέων Fc απ' ό τι τα μονοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα και ορισμένα Τ-κύτταρα. Επομένως, ο συνδυασμός αντισωμάτων έναντι των ανοσοσφαιρινών με ένα pan-B αντίσωμα (καλούμενη οριοθέτηση Β-κυττάρου) μπορεί να βοηθήσει στην επιβεβαίωση ότι η έκφραση ανοσοσφαιρινών αφορά μόνο στον Β-κυτταρικό πληθυσμό, κάτι το οποίο και συστήνεται
- Σε αυτή την περίπτωση, αν και τα άλλα κύτταρα συχνά επιδεικνύουν την παρουσία κυτταροπλασματικής Ig, αυτή δεν θα παρεμβληθεί στην ανάλυση των Β-κυττάρων
- Επίσης στην ανάλυση ελαφρών αλυσίδων, ταυτόχρονη ανίχνευση έκφρασης των κ- και λ-αλυσίδων μπορεί να είναι επίσης χρήσιμη γιατί η πρόσδεση της κυτταροπλασματικής Ig γενικά περιλαμβάνει την αναλογία των κ- και λ- ανοσοσφαιρινών και τέτοια κύτταρα φαίνονται ως διπλά επισημασμένα (δεδομένου ότι δεν υπάρχει μονοκλωνικότητα ανοσοσφαιρίνης στον ορό) – Αντίθετα, τα Β-κύτταρα εκφράζουν μόνο μία ελαφρά αλυσίδα και φαίνονται ως μονά επισημασμένα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ-ΠΗΓΕΣ

1. Clinical and laboratory Standards Institute. Clinical Flow Cytometric Analysis of Neoplastic Hematolymphoid Cells; Approved Guideline, 2nd ed. CLSI document H43-A2, Vol.27, No. 11. Wayne, PA: Clinical and laboratory Standards Institute, **2007**.
2. Clinical and laboratory Standards Institute. Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline, 2nd ed. CLSI document H42-A2, Vol. 27, No. 16. Wayne, PA: Clinical and laboratory Standards Institute, **2007**.
3. <http://www.eie.gr/texnikos-asfaleias/texnikosasfaleias-gr.html>
4. www.ukneqasli.org
5. ELN - WP10 - Consensual recommendations on preanalytical precautions for the immunophenotyping of leukemia and immunoproliferative disorders (www.leukemia-net.org)