

Laborhandbuch

Immunphänotypische Analysen

Einführung

Die immunphänotypische Analyse mittels Durchflusszytometrie ist – gemäss WHO 2016 - ein integraler Bestandteil der multidisziplinären Diagnostik hämatopoetischer Neoplasien.

Die Technik der Immunphänotypisierung beruht auf dem Nachweis von membranären, cytoplasmatischen sowie nukleären Antigenen auf viablen Zellen. Zum Antigennachweis dienen fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper. Nach Inkubation mit den diagnostischen Antikörpern werden die Zellen im Durchflusszytometer hydrodynamisch einzeln vor einer Laserlichtquelle fokussiert. Die Fluorophore der zellgebundenen diagnostischen Antikörper werden durch das Laserlicht angeregt und emittieren ihrerseits Photonen (Licht) unterschiedlicher Wellenlänge; die Menge emittierter Photonen erzeugen Licht unterschiedlicher Intensität. Durch Messung der emittierten Lichtintensität und ihrer spektralen Aufspaltung anhand Filter können Rückschlüsse auf Antigenexpression und Expressionsstärke gezogen werden. Dies erfolgt durch manuelle Analyse mittels Analysesoftware der elektronischen Daten. Abhängig vom Durchflusszytometer, der Konfiguration der Filter und der Anzahl Laser können unterschiedlich viele Parameter von jeder einzelnen Zelle simultan gemessen werden. Aktuell in der Routine sind dies 12 Fluoreszenzen und 2 physikalische Parameter. Die Zahl der gemessenen Antigene kann durch Multiplex-Färbung weiter erhöht werden.

Der Immunphänotyp einer Zelle ist abhängig von der Zelllinienzugehörigkeit, dem Reifungsstadium sowie dem Aktivierungsstadium. Darüber hinaus können auch Medikamente die Antigenexpression verändern (zB Steroide) oder maskieren (Immun-Therapien). Abnorme Zellen unterscheiden sich von Normalen durch Abweichung der Expressionsstärke einzelner Antigene (Unter- oder Überexpression), durch Expression aberranter Antigene (aberrante Expression) oder durch Co-Expression von Antigenen, die im Normalfall in anderen Entwicklungsstadien exprimiert würden (asynchrone Expression). Aufgrund der inhärenten Komplexität des Immunphänotyps beruht die flowzytometrische Abklärung auf der Untersuchung mehrerer Antigene pro Zelltyp. Nebst der Charakterisierung des Immunphänotyps einzelner Zellen oder Zellpopulationen werden zur Abklärung dysplastischer Ausreifung auch die Expressionsmuster unterschiedlicher Reifungsstadien innerhalb einer Zellpopulation untersucht (Ausreifungsmuster).



Indikationen

Hämatologische Neoplasien

Die Immunphänotypisierung eignet sich zur Diagnose hämatopoetischer Neoplasien, zur Beurteilung des Therapieansprechens sowie zur Quantifizierung der minimalen Resterkrankung (MRD, measurable residual disease) während oder nach Therapie. Die Bedeutung der Immunphänotypisierung für die Diagnose ist bei den verschiedenen hämatopoetischen Erkrankungen unterschiedlich. Essentiell ist sie zur Bestimmung der Zelllinienzugehörigkeit akuter Leukämien. Insbesondere bei wenig differenzierten akuten Leukämien, oder Leukämien mit gemischter Linienzugehörigkeit ((mixed phenotype acute leukemias (MPAL) und acute undifferentiated leukemias (AUL)) spielt die Immunphänotypisierung bei der Diagnose sowie Therapiekontrolle eine besonders wichtige Rolle. Ebenso ist die Immunphänotypisierung für den Nachweis und die Klassifikation der Non-Hodgkin Lymphome, die auf dem Nachweis der Klonalität (Leichtkettenrestriktion bei Plasmazell/B-Zellproliferationen oder TCRVbeta-Kettenexpression bei T-Zell-Lymphoproliferationen) in Kombination mit einem abnormen Immunphänotyp beruhen, von Wichtigkeit.

Nur eine auxiliäre Rolle kommt der Immunphänotypisierung bei der Abklärung myelodysplastischer Syndrome bzw. myelodysplastischer/myeloproliferativer Erkrankungen zu. Keine Rolle spielt die Immunphänotypisierung für die Diagnose myeloproliferativer Erkrankungen - mit Ausnahme der Mastocytose sowie der Blastenkrise bei chronisch myeloischer Leukämie, da diese lymphatischer Zell-Linienzugehörigkeit sein können.

Sofern möglich, erfolgt die immunphänotypische Befundinterpretation und Diagnosestellung gemäss den Kriterien der WHO 2017 (1). Die Befundübermittlung erfolgt schriftlich (medianer TAT <22h). Eine interdisziplinäre Befunddiskussion und Interpretation erfolgt am wöchentlich stattfindenden Lymphom/Leukämie/Multiples Myelom-Tumorboard.

Immunologische Abklärungen

Die immunphänotypische Analyse wird zudem zur Abklärung von Immundefizienzen und Allergien eingesetzt. Im Hause werden die quantitativen Verfahren zur Bestimmung der Lymphocytensub-Populationen (single-platform Technik), die Abklärung des Autoimmun Lymphoproliferationssyndrom (ALPS) sowie der Basophilendegranulationstest (BAT) bei Wespen- und/oder Bienengift-Allergie eingesetzt. Zur Diagnose von Immundefizienzen (PID, primäre Immundefekte) wie CVID (common variable immunodeficiency) und CGD (chronisch granulomatous disease) werden die Proben in ein externes Labor versandt (Medizinische Immunologie, Universitätsspital Basel).

Andere immunphänotypische Tests

Die Quantifizierung hämatopoetischer Stammzellen (CD34-positive Stammzellen) bei Patienten im Programm für zelluläre Therapien erfolgt aus dem peripheren Blut während der Mobilisation zur Freigabe für die Stammzell-Apherese sowie aus dem Stammzell-Apheresepräparat. Dazu wird eine quantitative single-platform Technik eingesetzt.

Die Chimäre Antigenrezeptor (CAR)-T-Zelltherapie ist eine zielgerichtete Immuntherapie, zur Behandlung bestimmter Leukämien und Lymphome. Immunphänotypisch können solche CAR-T-Zellen nach Reinfusion in Verlauf detektiert und quantifiziert werden.

Zur Abklärung der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) wird die Expression an der Zellmembran durch GPI (Glykosylphosphatidyl Inositol) - verankerte Antigene nachgewiesen. Diese Analyse erfolgt in Erythrocyten, Monocyten und Granulocyten.

Der Eosin-5'-Maleimid (EMA)-Bindungstest ist ein Bestandteil der Diagnostik der Hereditären Sphärozytose (HS). EMA ist ein fluoreszierender Farbstoff, der an membran-verankerte Proteine der Erythrozyten bindet und durchflusszytometrisch quantifiziert werden kann.

Abklärungsalgorithmus hämatologischer Neoplasien

Im Hause werden die Proben mit Verdacht auf eine hämatologische Neoplasie einem spezifischen Screening unterzogen, welches von der Fragestellung abhängig ist (siehe Abb. 1). Die Wahl des Panels (Zusammensetzung diagnostischer Antikörper) beruht auf der klinischen Fragestellung, den klinischen Angaben sowie der verlangten Analyse. Ergibt sich im Screening der Verdacht auf eine abnorme Population, wird diese mittels spezifischer Panels weiter abgeklärt. Dieses Vorgehen beruht auf dem standardisierten Vorgehen nach EuroFlow (www.euroflow.org) und beinhaltet nebst Panelzusammensetzung (2) auch die Probenverarbeitung und Geräteeinstellungen (3). Bei anderen Analysen (PNH, BAT, EMA) wird, sofern vorhanden, nach publizierten Richtlinien vorgegangen.

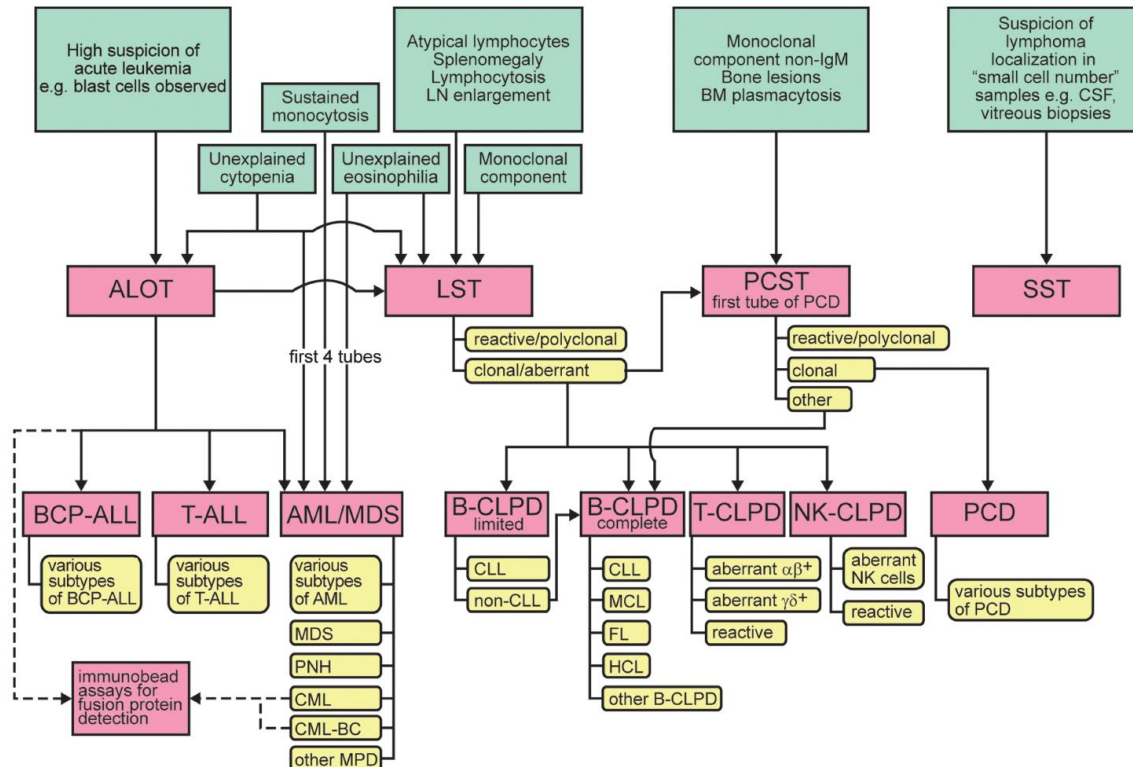


Abb. 1: Abklärungsalgorithmus nach EuroFlow (2). Abhängig von klinischen Angaben und Laborwerten des Patienten wird ein limitiertes Panel zum Screening einer hämatologischen Neoplasie eingesetzt. Zur Charakterisierung und Klassifizierung folgt eine erweitertes Panel. Abkürzungen: ALOT, acute leukemia orientation tube; ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; BC, blast crisis; BCP, B-cell precursor; BM, bone marrow; CLL, chronic lymphocytic leukemia; CLPD, chronic lymphoproliferative disorders; CML, chronic myeloid leukemia; CSF, cerebrospinal fluid; FL, follicular lymphoma; HCL, hairy cell leukemia; LN, lymph node; LST, lymphoid screening tube; MCL, mantle cell lymphoma; MDS, myelodysplastic syndrome; MPD, myeloproliferative disorders; PCD, plasma cell disorders; PCST, plasma cell screening tube; PNH, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; SST, small sample tube (Quelle <https://euroflow.org>)

Akute Leukämie / Minimal Residual disease (MRD)

Zuerst erfolgt die Zelllinienzugehörigkeit (B-, T- oder myeloische Linienzugehörigkeit) der Blasten (acute leukemia orientation tube). Konnte die abnorme Zellpopulation einer, oder selten mehreren, Zelllinie(n) zugewiesen werden, erfolgt die Charakterisierung der Blasten und ihrer Ausreifung anhand zelllinienspezifischer Panels (B-ALL, T-ALL, AML). Standardisiertes Vorgehen nach EuroFlow (2). Für die Verlaufskontrolle (Knochenmark) wird die Probe bei hypozellulärem Material zur Zellanreicherung vor Inkubation mit monoklonalen Antikörpern bulk-lysiert. Für die Bestimmung des MRD wird bei der B-ALL das BCP-ALL-MRD (B-cell precursor-acute leukemia) Panel von EuroFlow eingesetzt (Next-Generation Flowcytometrie (NGF)) (5), für die Bestimmung des T-ALL MRD das diagnostische T-ALL tube 1 und bei AML patientenspezifisch eines bis mehrerer der diagnostischen Tubes.



Die externe Qualitätskontrolle erfolgt durch Teilnahme an den folgenden UK-NEQAS Ringversuchen Leukemia Immunophenotyping und Leukemia Diagnostic Interpretation sowie EuroFlow QA und EuroFlow MM-MRD und BCP-ALL MRD

Autoimmun-lymphoproliferatives Syndrom (ALPS)

In der Probe wird der relative Anteil doppelt negativer (CD4-/CD8-) Zellen innerhalb des CD3+TCRalpha/beta+ T-Zellkompartimentes gemessen. Bei Patienten mit ALPS beträgt dieser Anteil $\geq 1.5\%$ aller Lymphocyten bzw. $\geq 2.5\%$ aller CD3+ T-Zellen. Dies entspricht einem der geforderten Kriterien für die Diagnose von ALPS. Diese Cut-off Werte gelten jedoch nur, wenn die Lymphocyten-subpopulationen in oder über ihren Normbereichen liegen (6).

Basophilen Aktivierungs- und Degranulationstest; Biene/Wespe (BAT; BADT)

Die Aktivierung und Degranulation der Basophilen nach Allergen-Exposition wird flowcytometrisch gemessen. Zu diesem Zweck wird dem Vollblut das mutmassliche Allergen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Die Aktivierung und Degranulation der Basophilen induziert die Expression oder Aufregulation bzw. Exposition verschiedener Moleküle (u. a. CD63, CD203c) auf der Zelloberfläche, welche mittels Immunphänotypisierung gemessen werden können.

CD34+ Stammzellen Quantifizierung

Die Quantifizierung der CD34+ Stammzellen erfolgt in einer Single-Platform Technik mit einem IVD-zertifizierten Kit (BD Stem cell Enumeration Kit) unter Verwendung der BD FACSuite Software und einer vorgegebenen Gatingmethode (nach ISHAGE)(10). Die interne Qualitätskontrolle erfolgt mit Prozesskontrollen mit hohen und tiefen bekannten CD34 Konzentrationen. Die externe Qualitätskontrolle erfolgt durch Teilnahme am NEQAS Ringversuch (CD34 Enumeration). Die autologe Stammzellensammlung erfolgt bei mobilisierten Patienten in der Regel bei einem absoluten Wert ≥ 20 CD34+ Stammzellen/ μl im peripheren Blut.

Chimäre Antigen Rezeptor (CAR) T-Zellen

Die CAR (Chimären Antigenrezeptor) -T-Zelltherapie ist eine zielgerichtete Immuntherapie, welche zur Behandlung von bestimmten Leukämien und Lymphom eingesetzt werden kann. Dafür werden körpereigene T-Zellen mittels einer Leukapherese dem Patienten entnommen und gentechnisch verändert, so dass die T-Zellen einen CAR präsentieren. Die CAR-T-Zellen werden danach dem Patienten mittels einer Infusion zurückgegeben. Der CAR erkennt jeweilige Zielantigene (z.B CD19) und kann durch spezifischer Bindung die Aktivierung des Immunsystems induzieren zur gezielten Eliminierung von malignen Zellen.

Mithilfe dieser Methode werden CAR-T-Zellen detektiert und quantifiziert. Die CAR-T-Zellen erkennen ein bestimmtes Zielprotein, dieses kann in Form eines FITC markiertem drop-in Protein (wie z.B CD19 Protein) im Panel integriert werden. So können die endogenen T-Zellen von den CAR-T-Zellen unterschieden werden.



Chronische Granulomatose (CGD-Abklärung, DHR-123 Test)

Die Diagnostik der NADPH-Oxidase Defizienz bei chronischer Granulomatose basiert auf der intrazellulären wasserstoffperoxid-abhängigen Oxidation des Substrats Dihydrorhodamine (DHR)-123 durch neutrophile Granulozyten. Dazu wird das Blut in verschiedenen Ansätzen mit fMLP, abgetöteten E. Coli-Bakterien sowie mit PMA (Phorbolmyristat Acetat) inkubiert, um den NADPH-Oxidase-Komplex zu aktivieren. Die Generierung von Wasserstoffperoxid in den Neutrophilen bewirkt eine Fluoreszenz des zugegebenen Indikators (DHR-123), welche durchflusszytometrisch gemessen wird. Die häufigste Mutation bei CGD betrifft das gp91phox Gen und ist X-chromosomal gelinkt (XL-CGD). Bei den autosomal-rezessiven Formen ist am häufigsten das p47phox Gen betroffen (AR-CGD). Daher wird für die CGD-Abklärung zusätzlich zum Patienten-Blut auch mütterliches Blut (Trärgertum) zur Resultatinterpretation benötigt. Dieser Test wird extern durchgeführt (Medizinische Immunologie, Universitätsspital Basel). Für Nachfragen und Informationen wenden Sie sich an die Laborleitung (061 556 55 81).

EMA (Eosin-5'-Maleimide) Bindungstest zur Abklärung der Hereditären Sphärozytose

EMA ist ein fluoreszierender Farbstoff, der an membran-verankerte Proteine der Erythrozyten bindet und durchflusszytometrisch quantifiziert werden kann. Da bei einer Hereditären Sphärozytose (HS) die Expression von Membranproteinen vermindert ist wird im Vergleich zu normalen Erythrozyten eine verminderte Intensität an gebundenem EMA gemessen, was in einer reduzierten Mean Channel Fluorescence (MCF) resultiert (11). In diesem Test wird die Patientenprobe mit drei Kontrollpatienten verglichen und das Resultat anschliessend in Form einer Ratio (Referenzbereich >0.89) angegeben (12). Der EMA-Bindungstest ist ein Bestandteil der Diagnostik der HS (siehe erweiterte Diagnostik von erythrozytären Membranopathien für weitere Informationen).

Lymphom / Minimal Residual disease (MRD)

Zuerst erfolgt das Screening für eine lymphatische Neoplasie und ihre Zelllinienzuteilung (B-, T- oder NK-Zellen). Konnte eine abnorme Zellpopulation nachgewiesen werden, erfolgt die Charakterisierung der abnormen Zellpopulation für die Klassifizierung des Lymphoms anhand zelllinienspezifischer Panels. Standardisiertes Vorgehen nach EuroFlow (2). Für die Verlaufskontrolle (Blut, Knochenmark) wird die Probe zur Zellanreicherung vor Inkubation mit monoklonalen Antikörpern bulk-lysiert. Für die Bestimmung des MRD wird bei CLL ein spezifischer MRD-Panel verwendet (Next-Generation Flowcytometrie (NGF)), bei anderen Lymphomen eines der dafür geeigneten diagnostischen Tubes. Die externe Qualitätskontrolle erfolgt durch Teilnahme an EuroFlow QA.

Lymphozyten-Subpopulationen: B-Lymphozyten (CD19, CD20, CD45), T-Lymphozyten (CD3, CD4, CD8, CD45), T-, B- und NK-Lymphozyten (CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/CD56, CD45)

Die Analyse erfolgt durch eine Quantifizierung der Lymphocytensubpopulationen in einer Single-Plattform-Technik mit einem IVD-zertifizierten Kit (BD Multitest 6-color TBNK) unter Verwendung der BD FACSuite Clinical Software und einer automatischen Gatingmethode. Im Blut werden relative (%) und absolute (pro μ l) Zellzahlen bestimmt; in anderen Untersuchungsmaterialien werden nur relative (%) Zellzahlen bestimmt. Die interne Qualitätskontrolle erfolgt durch Prozesskontrollen mit bekannten



Konzentrationen der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen. Die externe Qualitätskontrolle erfolgt durch Teilnahme am UK NEQAS Ringversuch Immune Monitoring.

Multiplres Myelom (MM)/ Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS)/MM-MRD

Plasmazellen werden im Knochenmark anhand der Co-Expression von CD138/CD38 identifiziert und quantifiziert. Innerhalb des Plasmazellkompartimentes wird die Expression von CD19, CD27, CD28, CD45, CD56, CD81 und CD117 auf der Oberfläche sowie die intracytoplasmatische Leichtkettenverteilung untersucht. Pathologische Plasmazellen können aufgrund einer Unterexpression von CD19, CD27, CD38, CD45, oder Überexpression von CD56, oder aberranter Expression von CD28 oder CD117, oder asynchroner Expression von CD20, in Kombination mit einer Leichtkettenrestriktion (oder keiner Expression von Leichtketten) identifiziert werden. Immunphänotypisch lassen sich in der Regel beim MM $\leq 3\%$ polyklonale Plasmazellen und beim MGUS $\geq 5\%$ polyklonale Plasmazellen innerhalb des Plasmazellkompartimentes nachweisen. Dazwischen besteht ein Graubereich. Standardisiertes Vorgehen nach EuroFlow (2). Für die Analyse einer minimalen Restinfiltration (MRD) wird das Knochenmark vor Inkubation mit monoklonalen Antikörpern zur Zellanreicherung bulk-lysiert. Es werden 7-10 Millionen kernhaltige Zellen evaluiert. Ein MRD Resultat wird nur abgegeben, wenn das erhaltene Material für Knochenmark repräsentativ ist (durch immunphänotypischen Nachweis von Mastzellen, B-Vorläuferzellen sowie myeloischer Vorläuferzellen). Standardisiertes Vorgehen nach EuroFlow mittels Next-Generation Flowcytometry (NGF) (4), LLOD 0,001%; LOQ 0,003%.

Myelodysplastisches Syndrom (MDS)

Es werden die hämatopoetischen Vorläuferzellen und ihre Ausreifung in die neutrophile, monocytäre und erythroide Zellreihe immunphänotypisch untersucht. Vorgehen nach EuroFlow (2). Die Beurteilung des MDS erfolgt gemäss Ogata-Score (9).

Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH)

In der flowcytometrischen Untersuchung wird die vollständige (TypIII) oder partielle (TypII) Defizienz von Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Zelloberflächen-Proteinen untersucht. Die untersuchten Zellen werden anhand monoklonaler Antikörper identifiziert: Erythrocyten (CD235a+), Monocyten (CD45+, CD64++, CD15-) und Granulocyten (CD45+, CD64+, CD15+). Nachfolgend wird auf diesen Zellen die Expression GPI-verankerter Antigene untersucht: Erythrocyten (CD59), Monocyten (CD14) und Granulocyten (CD24). Auf den Leukocyten wird zusätzlich die Bindung von FLAER (bakterielles, fluoreszierendes mutiertes Prototoxin) an die GPI-Anker untersucht. Bei Patienten mit einer PNH sind alle drei Zelllinien durch die GPI-Defizienz betroffen, was mit fehlendem/vermindertem Nachweis des GPI-verankerten Proteins bei gleichzeitig fehlender/verminderten Bindung von FLAER an die Zellen nachgewiesen werden kann. Die PNH-Klongrösse wird innerhalb des Granulocyten- und Monocytenkompartimentes angegeben und dient als Verlaufsparemeter. Patienten mit PNH haben ein erhöhtes Thromboserisiko, das Risiko dafür korreliert mit der PNH-Klongrösse. Kleine PNH-like Klone (0,002-0,01%) finden sich auch bei Gesunden. Kleine PNH-Klone lassen sich auch bei Patienten mit MDS (Klongrösse: 0,01-5%) und Patienten mit Aplastischer Anämie (Klongrösse: 0,1-10%) nachweisen. Im Einsatz ist ein hochsensitiver PNH-Test mit einer LOD von 0,001% in Erythrocyten, 0,01% in Granulocyten und 0,1% in Monocyten (7). Die interne Qualitätskontrolle erfolgt mit



einer Normalprobe, die externe Qualitätskontrolle erfolgt durch Teilnahme am UK NEQAS Ringversuch Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria.

Stammzellen-Aufbereitung/Kryopräservierung/Rücktransfusion

Pro geplanter Stammzell-Transplantation werden $\geq 2.5 \times 10^6$ CD34+ Stammzellen pro kg Körpergewicht des Patienten durch Apherese gesammelt. Die Kryopräservierung erfolgt nach Volumenreduktion in 7.5% DMSO. Nach Kryokonservierung wird die Probe in der Gasphase von Stickstoff gelagert (kälter als -160°C). Die Qualitätskontrolle des Transplantats beinhaltet die Bestimmung der CD34+ Stammzellzahl und eine Sterilitätsüberprüfung. Die Rücktransfusion beinhaltet das Auftauen des Reinfusionsmaterials, die Assistenz bei der Retransfusion, sowie der Dokumentation des Vorgangs. Das Vorgehen ist FACT-JACIE akkreditiert (8).

Systemische Mastozytose (SM)

Mastzellen werden im Knochenmark anhand ihrer Streulichteigenschaften und der Expression von CD117 identifiziert (CD117++, CD34-, HLA-DR-, CD45+). Bei einer SM exprimieren die pathologischen Mastzellen aberrant CD25 und/oder CD2, sowie in gewissen Fällen CD30. Dies gilt als minor Kriterium für die Diagnose einer SM (1).

Variables Immundefekt Syndrom (CVID)

Die B-Zellpopulationen werden immunphänotypisch in Gedächtnis B-Zellen, klassengewechselte B-Zellen, Plasmablasten, transitionale B-Zellen sowie CD21+ B-Zellen eingeteilt. Die T-Zellen werden immunphänotypisch in naive T-Zellen, Effektor/Zentrale Gedächtnis T-Zellen, regulatorische T-Zellen sowie recent thymic emigrants aufgeteilt. Dieser Test wird extern durchgeführt (Medizinische Immunologie, Universitätsspital Basel). Für Nachfragen und Informationen wenden Sie sich an die Laborleitung (061 556 55 81).



Wichtiges zu Probenmaterial

Blut und Knochenmark: EDTA- (allenfalls Heparin) antikoagulierte Proben.

- Ausnahme: für funktionelle (Ca-abhängige intrazelluläre Vorgänge) Tests wie Basophilendegranulationstest (BAT) und CGD-Test muss die Blutentnahme zwingend in ein heparin-enthaltendes Blutentnahmegefäss (ohne Trenngel) erfolgen.
- Für den CGD-Test eines Patienten muss eine Normalkontrolle und Mutterblut (Heparin ohne Trenngel) mitgeliefert werden. Telefonische Anmeldung ist erforderlich!

Liquor: in Transfix-Röhrchen entnommen oder Nativ

- Transfix: Für immunphänotypische Analysen wird die direkte Liquorentnahme in ein Stabilisierungsgefäss (TransFix) empfohlen. Die Probe bleibt so im Kühlschrank während 3 Tage stabil. Achtung: die leeren TransFix Röhrchen im Kühlschrank aufbewahren. Mit Liquor befüllte TransFix-Röhrchen sofort ins Labor verschicken.
- Nativ: sofort ins Labor! Telefonische Anmeldung zur sofortigen Bearbeitung.

Die immunphänotypische Analyse aus nativem Liquor muss innert 30-60 Minuten nach Probenentnahme erfolgen, da die Halbwertszeit der Zellviabilität im nativen Liquor lediglich ca. 30min beträgt. Bei mit peripherem Blut kontaminiertem Liquor ist bei Nachweis abnormer Zellen zusätzlich eine periphere Blutprobe zur Interpretation des Resultates im Liquor nötig.

Bronchoalveoläre Lavage: nativ

Punktate/Ergüsse: steriles Probengefäss, ohne Zusätze

- falls sehr blutig: in EDTA-Probengefäss entnehmen

Feinnadelpunktionen: nativ in sterilem Gefäss mit physiologischer Kochsalz-Lösung (NaCl).

- Umgehend ins Labor!
- Fixierte Proben können nicht verarbeitet werden!

Biopsien: in sterilem Gefäss mit physiologischer Kochsalz-Lösung (NaCl).

- Umgehend ins Labor
- Fixierte Proben können nicht verarbeitet werden!

Für Details zur Probenanmeldung, Probenannahmezeiten und Nachbestellung verweisen wir auf das Vademecum.



Literatur

1. Swerdlow SH et al., WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues Volume 2; IARC WHO Classification of Tumors No 2. IARC Press Lyon, 2017
2. JJM van Dongen, L Lhermitte, S. Boettcher, J Almeida, VHJ van der Velden et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, 2012.
3. T Kalina, J Flores-Montero, VHJ van der Velden, M Martin Ayuso, S Boettcher et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, 2012
4. J Flores-Montero, L Sanoja-Flores, B Paiva, N Puig, O Garcia Sanchez et al. Next generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*, 2017
5. P Theunissen, E Mejstrikova, L Sedec, AJ na der Sluijjs-Gelling, G. Gaipa et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2017.
6. JB Oliveira, JJ Bleesing, U Dianzani, TA Fleisher, ES Jaffe et al. Revised diagnostic criteria for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International workshop. *Blood*, 2010.
7. A, Dezern, DR Sutherland, A. Illingworth, T. Oldaker et al. Consensus Guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related Disorders Part 1-4. *Cytom B*, 2018.
8. International Standards for hematopoietic cellular therapy product collection, processing and administration (FACT-JACIE)
9. K Ogata, Y Kishikawa, C Satoh, H Tamura, K Dan, A Hayashi. Diagnostik application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2006.
10. M Keeney, I Chin-Lee, K Weir, J Popma, R Nayar, DR Sutherland. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Cytometry*, 1998.
11. May-Jean King et al., Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. *British Journal of Hematology* 111, 2000
12. Hunt L. et al., Toward the Harmonization of Result Presentation for the Eosin-5'-Maleimide Binding Test in the Diagnosis of Hereditary Spherocytosis. *Cytometry Part B*, 2015