



AF BIOANALYTIKER ANETTE HØJGAARD ANDERSEN,
PATOLOGIAFDELINGEN, ROSKILDE SYGEHUS

BIOANALYTIKER GITTE WINTHER THOMSEN,
KLINISK BIOKEMISK AFDELING, ROSKILDE SYGEHUS

Flow på tværs

I 2004 blev det i det daværende Roskilde Amt besluttet, at der skulle indføres flowcytometri på Roskilde Sygehus som et samarbejde mellem Klinisk Biokemisk Afdeling, Patologiafdelingen og Onkologisk/Hæmatologisk Afdeling. Der blev oprettet et markørlaboratorium.

Markørlaboratoriet er placeret på Klinisk Biokemisk Afdeling på Roskilde Sygehus, og vi er to bioanalytikere, der deles om at betjene laboratoriearbejdet, én fra Klinisk Biokemisk Afdeling og én fra Patologiafdelingen. Derudover har vi endnu en bioanalytiker på Klinisk Biokemisk Afdeling, der fungerer som backup, hvis vi f.eks. begge skal på kursus.

Da vi ikke havde nogen erfaring inden for flowcytometri, blev vi i forbindelse med køb af apparatur sendt på kursus i England, hvor vi lærte at betjene flowcytometeret. Vi lærte også lidt om, hvordan vi behandler data.

I begyndelsen var vi meget spændte på, hvordan det skulle gå med at arbejde sammen med én fra "et andet speciale", men vi må indrømme, at det kun har været en fordel! Vi har hver vores forskellige kompetencer, og vi synes, at vi supplerer hinanden rigtig godt. F.eks. har den ene af os stort indblik i hæmatologi, brug/aflysning af det øvrige hæmatologiudstyr samt differentialtælling af blod, hvor den anden har stort indblik i anvendelsen af antistoffer og patologiske tilstande.

Det flowcytometriske analyseprincip

Flowcytometri er en hurtig og kvantitativ analyse af celler i suspension. Vi udfører i øjeblikket markørundersøgelse på knoglemarv, perifert blod, spinalvæske og BAL-væske, som benyttes til udredning af hæmatologiske sygdomme (leukæmier og lymfomer).

Vi udfører en multiparameter-analyse ved at farve med flere antistoffer rettet

mod forskellige antigener på samme tid. Det gøres ved at anvende antistoffer, der er mærket med hvert sit fluorochrom. Vi tilsætter op til fem forskellige antistoffer/markører til hvert prøverør. Når vi får et fluorescerende farvestof bundet til en bestemt komponent på/i en celle, vil den målte fluorescens repræsentere mængden af den pågældende komponent på/i cellen. Ud over oplysningen om de fem anvendte antistoffer/markører får vi også oplysning om cellens størrelse og granulering, dvs. at vi i alt får oplysning om syv parametre pr. celle.

Resultaterne vises i et histogram eller "dot-plot", som den relative fordeling af fluorescens-signaler inden for den målte population af celler.

Værdierne bliver lagret som rådata i computeren, hvilket medfører, at vi ved hjælp af et avanceret specialprogram kan undersøge de forskellige markørers indbyrdes fordeling.

Antistoffer

De fleste antistoffer, vi arbejder med, tilhører IgG-immunglobulinerne. Et IgG-molekyle er opbygget af to lange og to korte polypeptidkæder, der indbyrdes er forbundet ved hjælp af disulfid-broer (S-S). De to lange kæder er identiske inden for samme molekyle og kaldes tunge kæder. (De tunge kæder kan være af IgG-, IgA-, IgD-, IgE- og IgM-type). De to korte kæder, der også er identiske inden for samme molekyle, kaldes lette kæder og kan være af Kappa- eller Lambda-type. Normalt har man en næsten ligelig fordeling af Kappa og Lambda. Har man overvægt af enten



ANTAL PRØVER OG DIAGNOSER

I 2007 analyserede vi i alt 263 prøver i markørlaboratoriet

Prøvernes fordeling var:

Akut leukæmi: 8 %

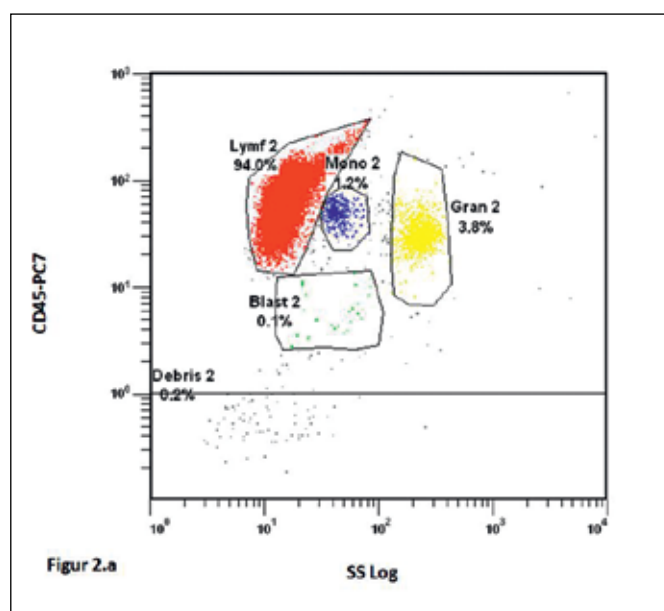
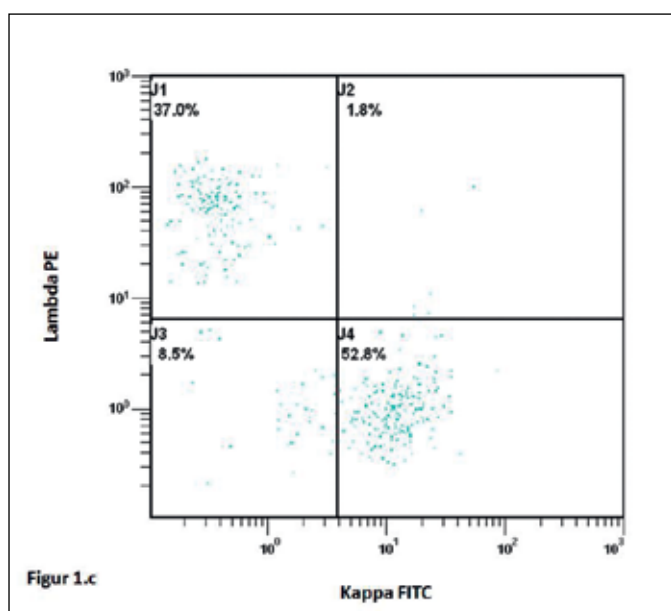
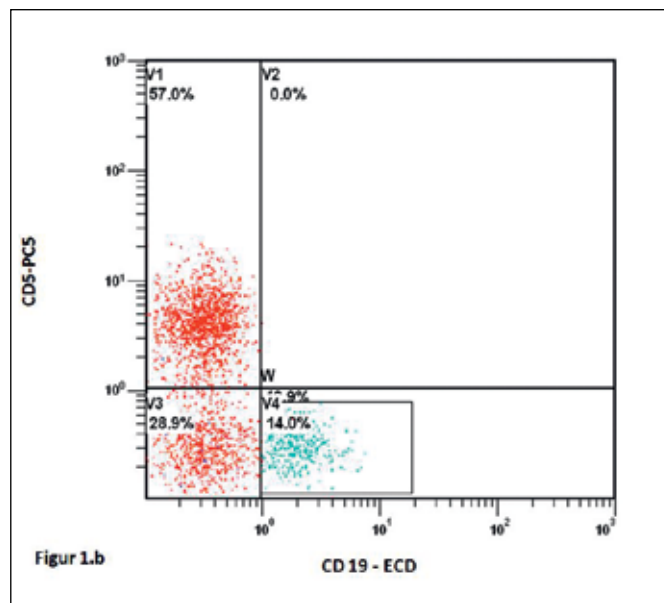
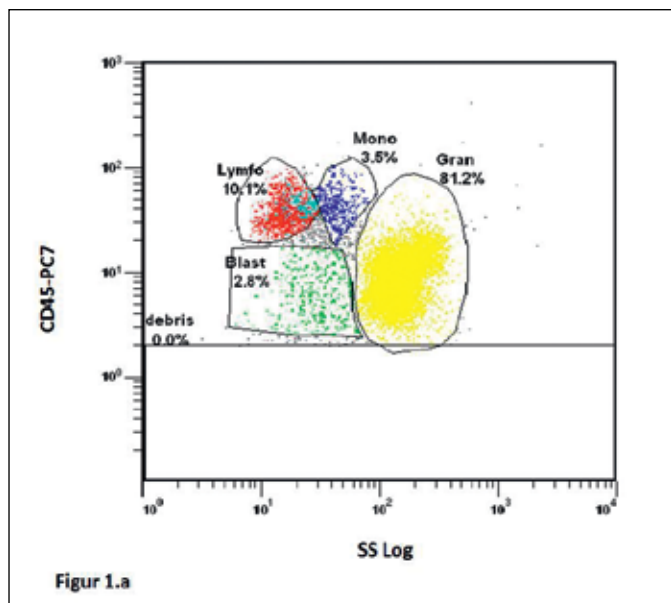
CLL: 9 %

Lymfom: 15 %

Andet: 13 %

Uden abnorm markørprofil (inkl. behandlingskontrol): 55 %

CD er en forkortelse for Cluster of Differentiation.



Kappa eller Lambda, taler man om monoklonalitet, det vil sige, at cellerne stammer fra den samme modercelle. Kræftsygdomme er monoklonale.

Analyse af data

Når vi analyserer en prøve, sætter vi først vores afgrænsninger (gates) omkring cellegrupperne korrekt. Størrelsen af cellegrupperne varierer lidt fra patient til patient. Disse gates sættes altid i det plot, hvor vi har CD45/SS-Log (SS = cellens granulering, CD45 = leucocyt-modningsmarkør). Herefter vurderer vi, hvordan fordelingen af leucocytter ser ud for at finde ud af, hvilken cellegruppe vi skal koncentrere os om.

De hæmatologiske lidelser, vi undersøger for, har hver deres specielle fænotype. Det vil sige, at de vil reagere forskelligt med de antistoffer, vi tilsætter og analyserer.

Eksempel på forskellige fænotyper:

CLL (kronisk lymfatisk leukæmi): CD19+, CD5+, CD20+/negativ, CD23+, FMC7-negativ, har ofte svag ekspresion af lette kæder (Kappa/Lambda).

MCL (Mantlecelle-lymfom): CD19+, CD5+, CD20++, CD23-negativ, FMC7+, har ofte kraftig ekspresion af lette kæder (Kappa/Lambda)

Fordele ved flowcytometri

Flowcytometrisk analyse giver på grund af stor følsomhed og analyse af mange celler (30.000 celler pr. rør) markante fordele:

1. Påvisning af mindre mængde celler, der umiddelbart har normalt udseende, men frembyder abnorm markørprofil og således indikerer malign sygdom. Der er eksempler på, at malign diagnose kun har kunnet stilles ved en flowcytometrisk undersøgelse.
2. Påvisning af mindre mængde tilbageværende maligne celler efter kemo-

For at illustrere vores arbejde har vi valgt nogle "dot-plots", der viser forskellen på en patient med normal markørundersøgelse (figur 1.a, 1.b, 1.c) og en patient med kronisk lymfatisk leukæmi (CLL) (figur 2.a, 2.b, 2.c).

PLOTS

(figur 1.a, 1.b, 1.c, 2.a, 2.b, 3.c)

1.a: viser patient med normal fordeling af leucocytter. (SS = cellens granulering, CD45 = leucocyt-modningsmarkør)

1.b: viser fordelingen af lymfocytter: B-celler, som er CD19+, T-celler, som er CD5+, NK-celler er negative for både CD5 og CD19. Bemærk, at der ikke ses nogle celler, som er dobbelt-positive for CD5 og CD19.

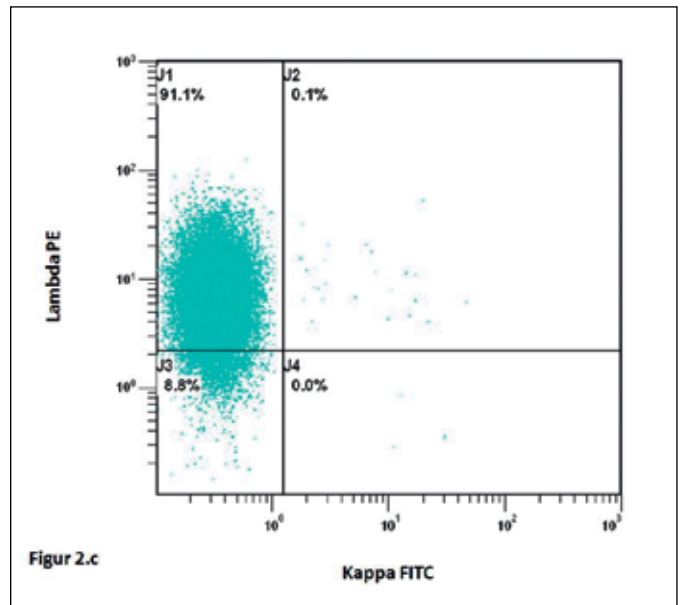
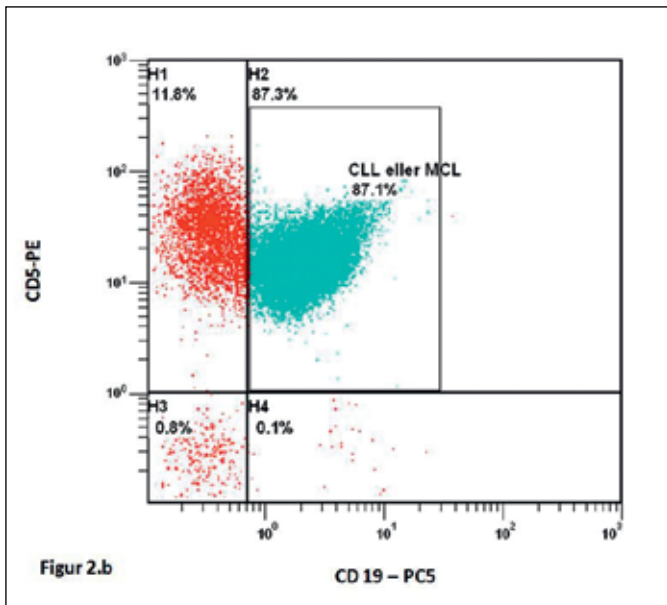
1.c: viser, at der er ligelig fordeling af Kappa++ og Lambda+ B-celler.

2.a: viser patient med abnorm fordeling af leucocytter. Der ses 94 % lymfocytter.

2.b: viser en abnorm population (blå), som er dobbelt-positive for CD5 og CD19. En normal lymfocyt kan ikke både være en B- og T-lymfocyt.

2.c: viser, at der er massiv overvægt af Lambda+, det vil sige, at det er monoklonale celler.

Det skal bemærkes, at vi analyserer flere markører end ovenstående for at kunne stille en diagnose.



>>>

terapibehandling. Dette kan indikere behandlingsskift eller yderligere behandling.

3. En tiltagende mængde patienter behøver ikke at få foretaget knoglemarvsundersøgelse, da diagnosen ved flowcytometri med sikkerhed kan stille diagnosen alene på perifert blod.

Arbejdsorganisering på tværs

Rent praktisk er det sådan, at vi skiftes til at arbejde i markørlaboratoriet, så vi er der sjældent samtidig. Det betyder naturligvis, at det har været nødvendigt at etablere aftaler omkring intern kommunikation, idet vi fysisk er på hver vores afdeling. Vi har løst kommunikationsudfordringerne ved, at vi dels skriver i en logbog, der ligger i markørlaboratoriet og dels mailer/ringer en del sammen, især hvis der er problemer. På denne måde forsøger vi at hjælpes ad med at løse tingene, og det fungerer faktisk rigtig godt.

Den af os, der skal udføre flowcytometriske analyser, er i markørlaboratoriet fra ca. kl. 9.30 til ca. 15.30, dvs. at vi altid deltager i arbejdet på egen afdeling om morgenen.

Arbejdsgangen for en vilkårlig prøve

Når vi modtager en prøve, vil der på den medfølgende rekvisition være noteret, hvilket panel af antistoffer/markører vi skal vælge til vores analyse. Vores paneler består af mellem to og ni rør (af hver fem antistoffer). Valg af panel bliver foretaget af lægerne på Onkologisk/Hæmatologisk Afdeling.

Når vi har kørt en prøve i flowcytometret, analyserer vi selv resultaterne, hvorefter vi kommer med vores forslag til et diagnosesvar. Dette svar samt alle data kan ses både på Patologiafdelingen, Klinisk Biokemisk Afdeling og Onkologisk/Hæmatologisk Afdeling, idet der på alle afdelingerne står computere med flow-analyseprogrammet. Prøverne bliver i øjeblikket endeligt besvaret af en hæmatologisk overlæge, der kontrollerer/retter i vores forslag til diagnosesvar. Vi sørger så for, at svaret bliver sendt til den rekvirerende afdeling. Arbejdsgangen betyder, at vi har en del kontakt med andre afdelinger/personalegrupper på sygehuset, hvilket også er en spændende opgave.

patienter og høre, om svarene stemmer overens. Her har det vist sig, hvor godt flowcytometri og patologi supplerer hinanden. Flowcytometri kan påvise et meget lille antal syge celler, som det kan være svært at påvise histologisk eller cytologisk. I andre tilfælde er celle morfologien meget vigtig for den endelige diagnose. Disse oplysninger kan ikke opnås ved flowcytometri.

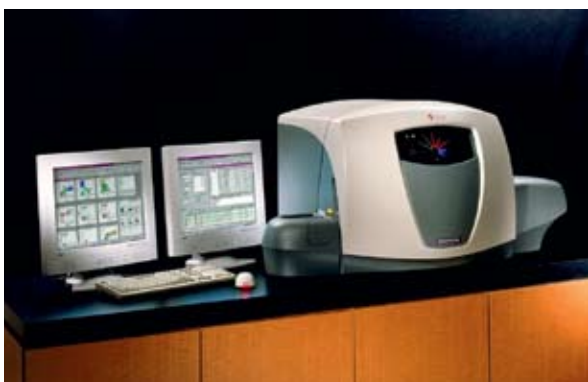
Flowmøder

Flowgruppen består, ud over os, af en overlæge fra Onkologisk/Hæmatologisk Afdeling, som for tiden er den eneste, der udgiver svar, en overlæge fra Patologiafdelingen, som er under oplæring i at udgive svar, og en overlæge fra Klinisk Biokemisk Afdeling, som står for den teoretiske del af flowcytometeret samt for kvalitetssikringen.

Med jævne mellemrum mødes hele flowgruppen for at diskutere eventuelle problemer, lægge strategi for fremtiden, udvælge nye indsatsområder og meget andet. Inspiration får vi blandt andet ved at deltage i internationale tværfaglige kurser, kongresser og brugermøder. En af vores kommende opgaver er at implementere flowcytometrisk markørunder søgelse på lymfeknuder og finnålsaspirater. Det kan formentlig betyde kortere svartid end ved de konventionelle diagnostiske patologimetoder, der benyttes i dag til denne type prøver.

Multidisciplinære konferencer

Én gang ugentlig er der hæmatologikonference mellem patologerne og hæmatologerne. Her deltager vi også, da det ofte er de patienter, vi har lavet markørunder søgelse på, som bliver diskuteret. Det er meget interessant og lærerigt, også at se de histologiske/cytologiske præparater på "vores"



Billede af flowcytometer FC 500