

 SØRLANDET SYKEHUS		Medisinsk serviceklinikk		Generelt dokument
Telling av leukocytter (LPK) i blodprodukter på CytoFLEX. Enhet for Immunologi, ImTra SSK.				Side 1 av 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.11-1	Godkjent dato: 02.09.2024	Gyldig til: 02.09.2026	Dato endret: 05.05.2025	Revisjon: 2.05

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/CytoFLEX

DISTRIBUSJONSLISTE: EK, I.1 Tarifold ved flowcytometer.

ENDRINGER FRA FORRIGE VERSJON: Forlenget gyldighet til 02.09.2026 uten endringer i dokumentet. 2.05 Endret til Ready to Use Daily QC fluorospheres. Endret Dest.vann til demineralisert vann.

HENSIKT/BAKGRUNN
Kontroll av blodprodukter. Tallet av leukocytter, LPK, i blodprodukter er normalt lavere enn deteksjonsgrensen for de fleste andre tellemetoder. Telling ved CytoFLEX muliggjør telling i lavt område som er aktuelt for kontroll av blodproduktene.

OMFANG
Bioingeniører og leger ved Enhet for immunologi.

AKKREDITERT ANALYSE	TATT I BRUK
Nei	Dato:19.09.18

ANALYSEPRINSIPP

Flowcytometri. For CytoFLEX har vi lisens for bruk av 2 lasere (488 nm og 638 nm) og 8 fargedetektorer.

Laser	Fluorescent Channel	CytoFLEX Channel Names	Commonly used Fluorescent Dyes
488 nm	525/40 BP	FITC	FITC, Alexa Fluor™ 488, CFSE, Fluo-3
	585/42 BP	PE	PE, PI
	610/20 BP	ECD	ECD, PE-Texas Red®, PE-CF594, PI
	690/50 BP	PC5.5	PC5.5, PCS, PerCP, PerCP-Cy5.5, PI, DRAQ7™
	780/60 BP	PC7	PC7, DRAQ7™
638 nm	660/10 BP	APC	APC, Alexa Fluor™ 647, eFluor™ 660, Cy5
	712/25 BP	APC-A700	APC-A700, Alexa Fluor™ 700, Cy5.5, DRAQ7™
	780/60 BP	APC-A750	APC-A750, APC-Cy7, APC-H7, APC-eFluor™ 780, DRAQ7™

LeucoSure: Prøven tilsettes lyseringsmedium for å frigjøre nukleinsyrer (lyseringsmediet lyserer både leukocytter og erythrocytter). Prøven blandes så med reagens som inneholder RNase (for å fjerne RNA i prøven) og propidium iodid (PI). Når RNA ikke lenger er til stede i prøven, vil propidium iodid binde seg til dsDNA. Siden erythrocytter og trombocytter ikke inneholder dsDNA, representerer PI bundet til dsDNA leukocytterne i prøven. Analysen utføres ved å tilsette en kjent mengde kuler (LeucoSure Fluorospheres), som videre benyttes til å regne ut konsentrasjonen av leukocytter i prøven.

Propidium Iodide eksiteres ved 488 nm og emitterer ved 560-630 nm.
 LeucoSure Fluorospheres eksiterer ved 488 nm og emitterer ved 525-700 nm.

Dermed er det laseren ved 488 nm, og fluorescenskanal 525 (FITC), 585 (PI) og 610 (PI) som benyttes. (CytoFLEX Channel Names: 525 (FITC), 585 (PE) og 610 (ECD))

LIS (lab-data system)
Unilab analysekoder: Telling av LPK= BPLPKF Restliste (arbeidsliste) = BPLPK-K Arbeidsliste: 432 LIS prosedyre: Unilab 700. Enhet for immunologi. ImTra SSK.

Dokumentet skal verifiseres av medisinsk ansvarlig overlege.

DokumentID: D46405

Utarbeidet av: Kristine Thomassen Berget, enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget og Hege Jahnsen	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Verifisert av: 13.09.2022 - Kvalitetskoordinator Kari - Ann Nedal
---	--	--	---

 SØRLANDET SYKEHUS		Telling av leukocytter (LPK) i blodprodukter på CytoFLEX. Enhet for Immunologi, ImTra SSK.			Side: 2 Av: 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.11-1	Utarbeidet av: Kristine Thomassen Berget, enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget og Hege Jahnsen	Godkjent dato: 02.09.2024	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Revisjon: 2.05

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/CytoFLEX

METODENS YTELSE	
Måleområde	Ikke aktuelt
Interferens/ kryssreaksjoner og andre feilkilder	Ufullstendig lysering av erytrocytter og leukocytter. Dubletter, cellerester (debris) samt ufullstendig behandling med RNase. Feil gating-strategi. Ujevn blanding av kulene (LeucoSure Fluorospheres) i løsningen som skal inn i flowcytometeret. Ferdig behandlet prøve utsettes for mye lyseksponering.
Usikkerhets vurdering	-

PRØVEMATERIALE	
Prøvemateriale	Blodprodukter
Prøvemengde	100 µl.
Prøve- behandling	Blodprøver fra erytrocyttkonsentrat skal oppbevares i kjøleskap ved 2-8 °C straks de kommer til oss. Prøver fra trombocyttkonsentrat skal oppbevares i romtemperatur. Prøvene skal behandles med reagens (lyseringsreagens og «stain» reagens) innen 3 døgn etter leukocyttfiltrering/produksjon. (refererer til rapport: « <i>Verifisering av CytoFLEX og kvalitetskontroll av blodprodukter</i> ». Finnes som link under kryssreferanser) Videre skal de behandlede prøvene tilsettes kuler innen 2 timer og analyseres innen 2 timer etter tilsetning av kuler.

REAGENSER																			
Leverandør	Nerliens Meszansky																		
Produsent	Bechman Coulter																		
Reagenser	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Artikkelnr.</th><th>Navn</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>C48093</td><td>FlowClean, 500ml</td></tr> <tr><td>B51503</td><td>CytoFLEX Sheath Fluid, (Føringsvæske), 10L</td></tr> <tr><td>81911</td><td>*H* ACCESS CONTRAD 70 (Dyprensevæske), 1L</td></tr> <tr><td>C65719</td><td>CytoFLEX Ready to Use Daily QC Fluorospheres</td></tr> <tr><td>175621</td><td>LeukoSure Enumeration Kit 200 tests IVD & CE</td></tr> <tr><td>175658</td><td>Leuko-Trol RBC Control Kit 200 tests IVD & CE</td></tr> <tr><td>175651</td><td>Leuko-Trol Platelet Control Kit 200 tests IVD & CE</td></tr> <tr><td>7547053</td><td>Flow-Count FLUOROSPHERES 20 ML LIQUID</td></tr> </tbody> </table> LeukoSure kit inneholder: 1 flaske lyseringsreagens. 2 flasker Stain reagens (fargereagens) med Propidium Iodide (PI) og RNase. 1 flaske Fluorosphere (kuler) med polystyrene fluorosphere (FITC).	Artikkelnr.	Navn	C48093	FlowClean, 500ml	B51503	CytoFLEX Sheath Fluid, (Føringsvæske), 10L	81911	*H* ACCESS CONTRAD 70 (Dyprensevæske), 1L	C65719	CytoFLEX Ready to Use Daily QC Fluorospheres	175621	LeukoSure Enumeration Kit 200 tests IVD & CE	175658	Leuko-Trol RBC Control Kit 200 tests IVD & CE	175651	Leuko-Trol Platelet Control Kit 200 tests IVD & CE	7547053	Flow-Count FLUOROSPHERES 20 ML LIQUID
Artikkelnr.	Navn																		
C48093	FlowClean, 500ml																		
B51503	CytoFLEX Sheath Fluid, (Føringsvæske), 10L																		
81911	*H* ACCESS CONTRAD 70 (Dyprensevæske), 1L																		
C65719	CytoFLEX Ready to Use Daily QC Fluorospheres																		
175621	LeukoSure Enumeration Kit 200 tests IVD & CE																		
175658	Leuko-Trol RBC Control Kit 200 tests IVD & CE																		
175651	Leuko-Trol Platelet Control Kit 200 tests IVD & CE																		
7547053	Flow-Count FLUOROSPHERES 20 ML LIQUID																		
Mottak av reagens	Følg enhetens rutiner Bestilling og mottak av reagenser, engangsutstyr og kritiske materialer, ImTra SSK.																		
Paknings- vedlegg	Det kontrolleres en gang i året at vi følger siste versjon av pakningsvedlegg. Loggføring av versjoner på pakningsvedlegg i bruk. Enhet for Immunologi. ImTra SSK. Ev. ny versjon vurderes og dokumenteres her: Håndtering av produktinformasjon fra Nerliens Meszansky (Aquios og Cytoflex). Enhet for immunologi. ImTra SSK.																		
Oppbevaring (med holdbarhet)	LeukoSure kit, QC kontroll og Leuko-trol kontrollene lagres ved 2 – 8 °C. Kjølerom 2017AN Enhet for immunologi.																		

 SØRLANDET SYKEHUS		Telling av leukocytter (LPK) i blodprodukter på CytoFLEX. Enhet for Immunologi, ImTra SSK.			Side: 3 Av: 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.11-1	Utarbeidet av: Kristine Thomassen Berget, enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget og Hege Jahnsen	Godkjent dato: 02.09.2024	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Revisjon: 2.05

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/CytoFLEX

	LeukoSure: Åpne flasker med PI reagens er holdbare i 60 dager, mens kulene er holdbare i 30 dager etter at flasken er åpnet. Returner reagensene til 2–8 °C straks etter bruk. Minimer eksponering for lys. Leuco-Trol: Returner glassene til 2–8 °C straks etter bruk og innen 30 min. Systemvæskene oppbevares i romtemperatur i skapet over CytoFLEX.
Tillaging (med holdbarhet)	Alle reagenser er klare til bruk.
Forholdsregler	Ved behandling av prøver <u>skal</u> hansker benyttes for å unngå smitte. Bruk hansker også ved håndtering av reagenser, vaskeløsninger og avfallsdunk. Ved kontakt med hud, skyll med store mengder vann.

UTSTYR OG KALIBRERING	
	Vippe benyttes til blanding av prøver og kontroller før analysering. En 500 µl pipette og en egen 100 µl pipette (merket CytoFLEX) benyttes til prøveforberedelse. Disse følger enhetens rutiner for kalibrering.
Rutine ved lotskifte	Kontrollresultater skal vurderes og godkjennes ved lotskifte av LeucoSure reagenser.

KVALITETSKONTROLL	
Kontroll materiale	Systemkontroll daily QC (Som del av oppstartsrutinen): CytoFLEX Ready to Use Daily QC Fluorospheres. Se brukermanualen kapittel 5. som beskriver hva som kontrolleres ved instrumentet med daglig QC kontroll. Laboratoriet er i tillegg med i SLP-program for alle aktuelle analyser. Interne kontroller: Leuko-Trol RBC og Leuko-Trol Platelet kontroll kit benyttes. Vi benytter en lav og en høy kontroll i hvert oppsett: annenhver måned benyttes Leuko-Trol RBC høyt nivå og Leuko-Trol Platelet lavt nivå, og annenhver måned motsatt. Da får vi kontrollert høyt og lavt nivå, og lysering i hvert oppsett. Holdbarheten på Leuko-Trol produktene er 30 dager etter at de er åpnet, eller til utløpsdato på esken. Vi kan benytte kontrollene i 14 dager utover dette før det skal rapporteres som styrt avvik.
Rutine ved lotskifte	Systemkontroll daily QC: Ved ny lot for Daily QC må nye grenser lastes ned fra Beckman Coulter sin hjemmeside. Se brukermanualen kapittel 5-7 for fremgangsmåte. Dette utføres så snart som mulig etter varemottak, og bemerkes at er utført i kommentarfeltet på rød lapp for ny lot. Utføres av fagansvarlig. Interne kontroller: Vi benytter definerte grenser fra leverandør til oppfølging av kontrollene. Ved lot-skifte av kontroller skal grensene oppdateres i Excel ark. For interne kontroller skal resultat beregnes ved hjelp av faktor fra LeucoSure kitet som benyttes (lotavhengig). Resultatene skal være innenfor de grenser som finnes vedlagt i Leuko-Trol kontroll kitet (lotavhengig).

UTFØRELSE	
Forberedelse	Ta ut en restliste i Unilab, og se over om vi har fått de prøvene vi skal ha:

 SØRLANDET SYKEHUS	Telling av leukocytter (LPK) i blodprodukter på CytoFLEX. Enhet for Immunologi, ImTra SSK.				Side: 4 Av: 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.11-1	Utarbeidet av: Kristine Thomassen Berget, enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget og Hege Jahnsen	Godkjent dato: 02.09.2024	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Revisjon: 2.05

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/CytoFLEX

	Velg rapportering, produksjonsliste. Under «Inkludere analyse / profil», velg analyser. Skriv inn analysekoden: bplpkf, tab. Skriv ut listen. Ta prøvene fra erythrocyttkonsentrat, kontroller og reagens ut av kjøll/kjøleskap. Disse skal ha romtemperatur før utførelse (prøvemateriale og kontroller 15 min., reagenser 30 min.)¹ Legg prøvene og kontrollene på vippe så de blir godt blandet før forbehandling. Finn fram flowprøverør, ett rør for hver prøve og kontroll. Merk flowprøverørene med etiketter fra Unilab og skriv ID på kontrollrør. Lag arbeidsliste i Unilab, og skriv ut. Se egen prosedyre for rutiner i Unilab.
Forbehandling av prøvene	1. Benytt pipetten som er merket til Flowcytometri og pipetter 100 µl av prøver og kontrollmateriale. Tørk av utsiden av pipettespissen og overfør materialet til hvert sitt flowprøverør. 2. Sett Leuko-Trol kontroller tilbake i kjølerommet innen 30 min. <u>Utfør forbehandlingen på 1-3 prøver av gangen:</u> 3. Tilsett 100 µl lyseringsreagens (vendes før bruk) og bland straks på vortex mikser i 5-10 sekunder. 4. Tilsett 500 µl stain reagens (vendes før bruk) og bland straks på vortex mikser. 5. Utfør forbehandlingen for alle prøvene som skal med i oppsettet. 6. Inkuber mørkt ved romtemperatur i 15 min. (Kan stå i maks. 2 timer). 7. Bland LeukoSure Fluorospheres godt. Unngå bobler. La stå mørkt før bruk.
Oppstart og QC kontroll på CytoFLEX	Se egen prosedyre: Bruk og vedlikehold av CytoFLEX instrumentet. Enhet for Immunologi. ImTra SSK.
Analysering av prøver	1. Bland kulene godt rett før bruk (unngå bobler), og tilsett 100 µl kuler til hver av prøvene (tørk av pipettespissen). Bland straks på vortex mikseren. 2. Blande godt rett før analysering. Analyser så snart som mulig og senest innen 2 timer. 3. Velg <i>Template: Leukocyt telling</i>, og lagre et nytt <i>eksperiment</i> med: Dagens dato + LS (LeukoSure) + lot nr. til LeukoSure Fluorospheres reagenset som benyttes. 4. Velg: <i>Delite multiple tubes</i>, huk av for <i>Select all</i>, fjern huket for tuben med ID = Vann, velg OK. 5. Kjør først et rør med vann (demineralisert vann eller sheatløsning). Sett røret i stativet (ev. velg <i>Initialize</i> og sett røret i stativet) og velg <i>Run</i>. Kjør igjennom systemet med vann og se etter at det ikke er mange «events» som telles. Kjør i ca. 30 sek. Trykk <i>Stopp</i>. 6. For å kjøre kontroller og prøver; velg <i>New tube</i> og legg inn ID og trykk tab. 7. Bland prøven og sett røret i stativet (ev. velg <i>Initialize</i> og sett røret i stativet). 8. Velg <i>Run</i>. Når du har kontrollert at målingene skjer som de skal; velg <i>Record</i>. Vent til den forhåndsdefinerte mengden med data er samlet opp. 9. Kjør et rør med destillert vann mellom hver av prøvene for å unngå overdraging. Marker den tuben som har fått ID = Vann, kjør denne på nytt. Du må da velge <i>Overwrite the data</i>, og OK. 10. Kjør så prøvene en og en. 11. Ta utskrift av rapport for hver av prøvene.

¹ Verifisering: Romtemperatur i reagens og celler. Blodbankene SSHF

 SØRLANDET SYKEHUS		Telling av leukocytter (LPK) i blodprodukter på CytoFLEX. Enhet for Immunologi, ImTra SSK.			Side: 5 Av: 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.11-1	Utarbeidet av: Kristine Thomassen Berget, enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget og Hege Jahnsen	Godkjent dato: 02.09.2024	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Revisjon: 2.05

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/CytoFLEX

Vedlikehold og avslutning av CytoFLEX	Se egen prosedyre: Bruk og vedlikehold av CytoFLEX instrumentet. Enhet for Immunologi. ImTra SSK.
--	--

VURDERING AV ANALYSERESULTATER	
Vurdering av prøvesvar	Vurdere gatene og endre ved behov. Kalkuler resultatene ved hjelp av en reagenslot-avhengig faktor. Regneark kan benyttes. $LPK = \text{Antall LPK i P1 gaten.} / \text{Antall kuler (10 000)} \times \text{lot spesifikk faktor}$
Vurdering av kontroller	Kontrollresultatene kalkuleres som for prøvesvarene. All kontrollvirksomhet overvåkes og godkjennes før frigivning av prøvesvar: Kontroller at kontrollene er innenfor grenser fra produsent. Loggfør kontrollresultatene i Excel ark. Ved avvik: Kontakt fagbioingeniør/enhetsleder og overlever utfylt skjema: Skjema for oppfølging av kvalitetskontroller. Enhet for immunologi, ImTra SSK. Videre statistiske vurderinger av kontroller utføres av faglig ansvarlig leder/bioingeniør. Vurderinger som utføres er beskrevet i egen prosedyre: Intern kvalitetskontrollovervåking, Enhet for immunologi, ImTra SSK.
Spesielle vurderinger	Avvikende utfall vurderes i samråd med enhetsleder og ev. lege.

SVARRAPPORTERING	
Referanse-område	Erytrocyttkonsentrat og trombocyttkonsentrat skal inneholde $< 1 \times 10^6$ leukocytter/enhet iht. blodforskriften. Eksempel (erytrocyttkonsentrat): 300 mL enhet er krav $< 3,33 \text{ LPK}/\mu\text{l (M/L)}$ 350 mL enhet er krav $< 2,86 \text{ LPK}/\mu\text{l (M/L)}$ 450 mL enhet er krav $< 2,22 \text{ LPK}/\mu\text{l (M/L)}$
Benevning	Celler/ μl = M/L (tilsvarer $10^6/\text{L}$)
Antall desimaler	Utgis som: <0,5, 1, 2 osv. Hele tall uten desimaler.
Registrering	Legg resultatene inn i Unilab.
Teknisk validering	Teknisk valider resultatene i Unilab. Telletall ≥ 2 rapporteres straks til den lokasjonen som har framstilt blodproduktet. - For rapportering til SSA og SSF: finn nummer i telefonlisten på stillerommet. Loggfør i Unilab at svar er ringt inn. For utførelse, se: LIS prosedyre: Unilab 700. Enhet for immunologi. ImTra SSK. - For å rapportere til SSK: ta utskrift av unilab arbeidsliste med ferdig utfylt svar, og lever denne til enhetsleder/fagbioingeniør på Enhet for tapping og produksjon. Loggfør rapporteringen som internkommentar i Unilab. Beregninger og svar som er lagt inn kontrolleres av en annen bioingeniør. Utskrift av rapportene fra CytoFLEX og fra Unilab, samles og settes i egen perm. Unormale plot og telletall skal vurderes av fagansvarlig før svar rapporteres. Ev. kan det ringes inn i forkant beskjed om at blodproduktet bør sperres midlertidig til teknisk validering er utført.

 SØRLANDET SYKEHUS		Telling av leukocytter (LPK) i blodprodukter på CytoFLEX. Enhet for Immunologi, ImTra SSK.			Side: 6 Av: 6
Dokumentplassering: II.MSK.ImTra.2.g.11-1	Utarbeidet av: Kristine Thomassen Berget, enhetsleder	Fagansvarlig: Kristine T. Berget og Hege Jahnsen	Godkjent dato: 02.09.2024	Godkjent av: Avdelingssjef Lene Haugen Tryland	Revisjon: 2.05

Medisinsk serviceklinikk/Avd. for immunologi og transfusjonsmedisin SSK/Pasienter og brukere/Immunologi/CytoFLEX

Medisinsk validering	Unormale plot vurderes i samråd med lege.
---------------------------------	---

OPPBEVARING AV PRØVEMATERIALE ETTER ANALYSERING
Prøvene oppbevares fram til fredag samme uke før de kastes.

AVFALLSHÅNDTERING
Forbruksmateriell som har lite blodsøl/en dråpe, kastes i vanlig søppel. Prøverør med ID kastes i gul dunk. Glass/plast med kroppsvæsker skal kastes som risikoavfall. All plast skal kastes i plastavfall. Blå plastbeholder til alt papir som inneholder pasientdata, ellers alt annet papir til grønn beholder. Ved behandling av prøver og alle reagenser som er i kontakt med prøver, skal hansker benyttes for å unngå ev. smitte. Ved behov; se Stoffkartoteket.

Kryssreferanser:

[II.MSK.FEL.LAB](#)
[FEL.IMTRA FEL.4.6-6](#)
[II.MSK.ImTra.2.a.3-1](#)

[II.MSK.ImTra.2.g.4-5](#)
[II.MSK.ImTra.2.g.4-13](#)

[II.MSK.ImTra.2.g.5.6-1](#)

[II.MSK.ImTra.2.g.7.1-1](#)
[II.MSK.ImTra.2.g.7.1-5](#)
[II.MSK.ImTra.2.g.7.3-1](#)
[II.MSK.ImTra.2.g.7.3-5](#)

[II.MSK.ImTra.2.g.11-3](#)

[Verifisering: Romtemperatur i reagens og celler. Blodbankene SSHF](#)

[Bestilling og mottak av reagenser, engangsutstyr og kritiske materialer, ImTra SSK.](#)

[LIS prosedyre: Unilab 700. Enhet for immunologi, ImTra SSK.](#)
[Loggføring av versjoner på pakningsvedlegg i bruk. Enhet for Immunologi, ImTra SSK.](#)

[Verifisering av CytoFLEX og kvalitetskontroll av blodprodukter. Enhet for Immunologi, ImTra SSK.](#)

[Intern kvalitetskontrollovervåking, Enhet for immunologi, ImTra SSK.](#)
[Skjema for oppfølging av kvalitetskontroller. Enhet for immunologi, ImTra SSK.](#)
[Service/tekniske feil ved instrument. Enhet for Immunologi, ImTra SSK.](#)
[Håndtering av produktinformasjon fra Nerliens Meszansky \(Aquios og Cytoflex\). Enhet for immunologi, ImTra SSK.](#)

[Bruk og vedlikehold av CytoFLEX instrumentet. Enhet for Immunologi, ImTra SSK.](#)

Eksterne referanser:

[2.12 Blodforskriften](#)

Pakningsvedlegg: [O:\Medisinsk serviceklinikk\Avdeling for IMM-TRA SSK\ImTra\A immunologi\Pakningsvedlegg](#)