

'Flowcytometrie bij MDS'



# Richtlijn Flowcytometrie bij MDS

Werkgroep 'Flowcytometrie bij MDS'  
Nederlandse vereniging voor Cytometrie

Daniel den Hoed Kliniek, Rotterdam  
Erasmus Medisch Centrum, Rotterdam  
Isala klinieken, Zwolle  
Sanquin, Amsterdam  
SKION, Den Haag  
Universitair Medisch Centrum Groningen  
Universitair Medisch Centrum Radboud, Nijmegen  
VU Medisch Centrum, Amsterdam

## **DOEL EN STREKKING**

Dit document beschrijft de monstervoorbereiding, monsteropwerking en meting ten behoeve van de immunofenotypering van patiënten met de verdenking myelodysplastisch syndroom met behulp van de flowcytometer. Daarnaast zijn richtlijnen ten behoeve van analyse van de data en interpretatie van de resultaten weergegeven.

## **INLEIDING**

De diagnostiek van myelodysplastisch syndroom (MDS) berust op morfologische en cytogenetische criteria. De immunofenotypering van beenmerg zou een bijdrage kunnen leveren aan het stellen van de diagnose. Bij de immunofenotypering wordt met behulp van een panel monoklonale antistoffen de antigene opmaak van verschillende subpopulaties hematopoetische cellen bepaald. Dit is van belang voor het bepalen van afwijkingen in de uitrijping van bloedcellen ofwel hematopoiese.

## **Referentiewaarden**

Ieder laboratorium dient beenmerg van minimaal tien gezonde individuen te bepalen. Deze gezonde individuen dienen van een overeenkomstige leeftijdscategorie te zijn als de van MDS verdachte beenmergen. Deze resultaten dienen als referentie voor het beoordelen van de resultaten.

## **PRINCIPE**

Met behulp van bepaalde combinaties van monoklonale antistoffen, welke direct gekoppeld zijn aan fluorochromen, kunnen differentiatiepatronen van verschillende subpopulaties (erytroïde cellen, blasten, granulocyten, en monocytten) in kaart worden gebracht. Het panel monoklonale antistoffen (zie verder in dit document) dat hier voor wordt gebruikt, is vastgesteld door de werkgroep 'Immunofenotypering bij MDS' van de NVC.

In normaal beenmerg zijn de differentiatie patronen binnen een subpopulatie zeer constant. Afwijkingen in de differentiatie of expressie kunnen wijzen op een ziekteproces.

Voorbeelden van een afwijking zijn een lage of hoge expressie van een bepaald antigeen of de expressie van een "lineage infidelity marker" (expressie van een marker die normaal gesproken niet tot expressie wordt gebracht op myeloïde cellen).

## **UITVOERING**

### **Monsterafname en verwerking**

Het beenmerg wordt afgenomen in Heparine, Citraat of EDTA. EDTA kan de expressie van calcium gebonden antigenen beïnvloeden. Om deze reden verdient Heparine ontstold beenmerg de voorkeur.

Bloedbijmenging kan de analyse van voornamelijk de uitrijping van de granulocyten beïnvloeden.

De verwerking van de beenmerg monsters dient binnen 24 uur na afname plaats te vinden. Eventuele toevoeging van een kweekmedium met glucose (verhouding 1:1) kan de cellevitaliteit verlengen.

## 'Flowcytometrie bij MDS'

De isolatie van de leukocyten wordt verricht door middel van het lyseren van de rode bloedcellen met behulp van ammoniumchloride (NH<sub>4</sub>Cl). Om buis tot buis verschillen door lysis te minimaliseren, dient er gebruik gemaakt te worden van bulk lysis.

De lysisoplossing dient geen fixatief te bevatten. Een fixatief zorgt voor veranderingen in scatter patronen en merker expressie. Dit kan de analyse van de differentiatiepatronen bemoeilijken.

Indien er na de lysisstap nog macroscopisch rode bloedcellen aanwezig zijn, is een tweede lysisstap aan te bevelen. De aanwezigheid van een overmaat aan niet kernhoudende rode bloedcellen maken het gaten van de leukocyten subsets zeer lastig.

### Antistof kleuring

De werkgroep 'Immunofenotypering bij MDS' heeft onderstaand antistofcombinaties opgesteld:

Combinatie:

1	CD45	PBS	PBS	PBS
2	CD45	CD16	CD11b	CD13
3	CD45	CD71	CD117	CD235a
4	CD45	CD15	CD11b	HLA-Dr
5	CD45	CD36	CD14	CD33
6	CD45	CD34	CD123	HLA-Dr
7	CD45	CD34	CD117	CD13+CD33
8	CD45	CD34	CD7	CD56
9	CD45	CD34	CD5	CD19
10	CD45	CD34	CD11b	CD15

### *Te gebruiken fluorochromen:*

De antistoffen in bovenstaande tabel zijn te gebruiken met verschillende fluorochromen. Ieder lab kan dit naar aanleiding van beschikbare antistoffen inrichten in meervoudige kleuringen. Bij de keuze voor de fluorochromen dient er rekening gehouden te worden met de markers waarvan bekend is dat deze zwak tot expressie worden gebracht. Deze zwakke markers dienen bij voorkeur gemeten te worden met een sterk fluorochroom (bijv. PE of APC). Daarnaast verdient het de voorkeur om CD34 aan te kleuren met een APC gelabelde antistof. Dit vergemakkelijkt de gating op de CD34 positieve populatie en dus de detectie van aberranties op deze cellen.

Het spreekt voor zich dat de antistoffen getitreerd dienen te worden op daarvoor geschikt materiaal.

### *Aspecifieke binding*

Aspecifieke binding van o.a. T-cellen aan monocyten kan voorkomen worden door een pré-incubatie met humaan Immunglobuline of humaan serum.

De antistoffen dienen verdund te worden in een wasbuffer (PBS met BSA of HSA).

Bij voorkeur wordt er per combinatie 500.000 cellen gekleurd. Hierdoor kan er een constant aantal cellen geanalyseerd worden.

Na incubatie (15 minuten, kamertemperatuur, donker) worden de cellen één maal gewassen met wasbuffer en vervolgens geresuspendeerd in wasbuffer. De cellen zijn nu gereed voor het meten op een flowcytometer.

## 'Flowcytometrie bij MDS'

Het inlezen van de monsters dient binnen 3 uur te gebeuren, bij voorkeur direct na de wasstap. Indien de gekleurde monsters niet direct gemeten kunnen worden, dienen deze in de koelkast bewaard te worden.

### **Instrument setup**

Voor flowcytometrie bij MDS is een juiste instrument set-up (PMT voltages en compensatie matrix) van groot belang. De flowcytometer dient dagelijks gecontroleerd te worden met behulp van multicolor beads. De controle van de compensatie settings kan wekelijks geschieden.

De dagelijkse controle dient genoteerd te worden zodat eventuele verloop in de sensitiviteit van de lasers zichtbaar is. Een mogelijkheid hiervoor zijn de Levy-Jenning plots. Een minimaal verloop in de sensitiviteit is nodig voor een juiste vergelijking van de MDS aanvragen ten opzichte van de (eerder gemeten) normale controles.

### **Inlezen van de samples**

Per antistofcombinatie dienen minimaal 100.000 leukocyten (CD45 positief) gemeten te worden. Indien er sprake is van een kleine populatie cellen, zoals vaak bij CD34 positieve cellen, dienen er minimaal 250 events van de betreffende populatie ingelezen te worden.

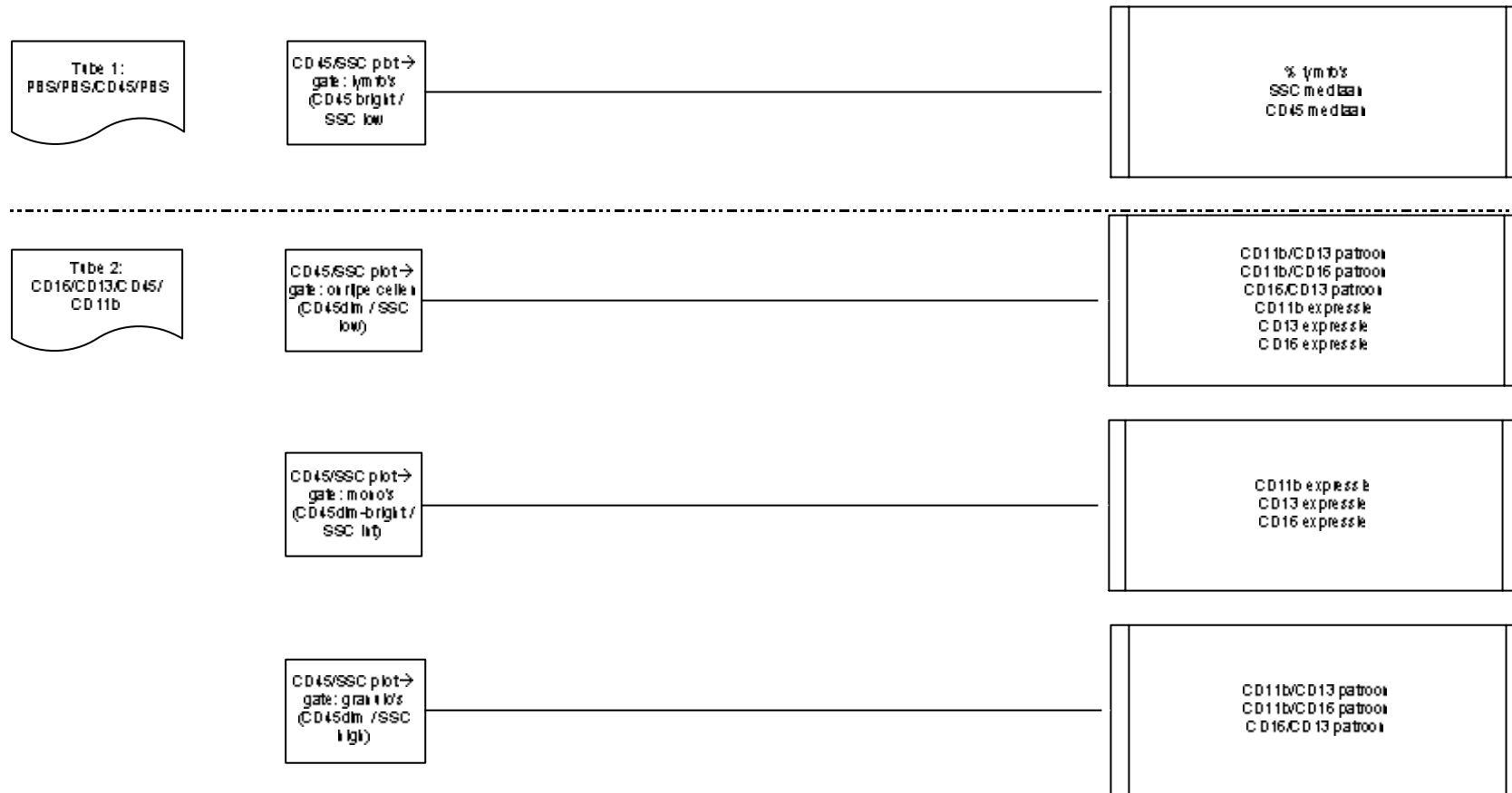
### **Analyse van de data**

De verschillende antistofcombinaties worden via onderstaande stroomschema's geanalyseerd. Bij de stroomschema's is de FSC/SSC gate overal weggelaten. Deze gate dient bij elke analyse als eerste gezet te worden voor het uitsluiten van debris. Er dient opgemerkt te worden dat de kernhoudende rode cellen niet uitgesloten worden voor analyse.

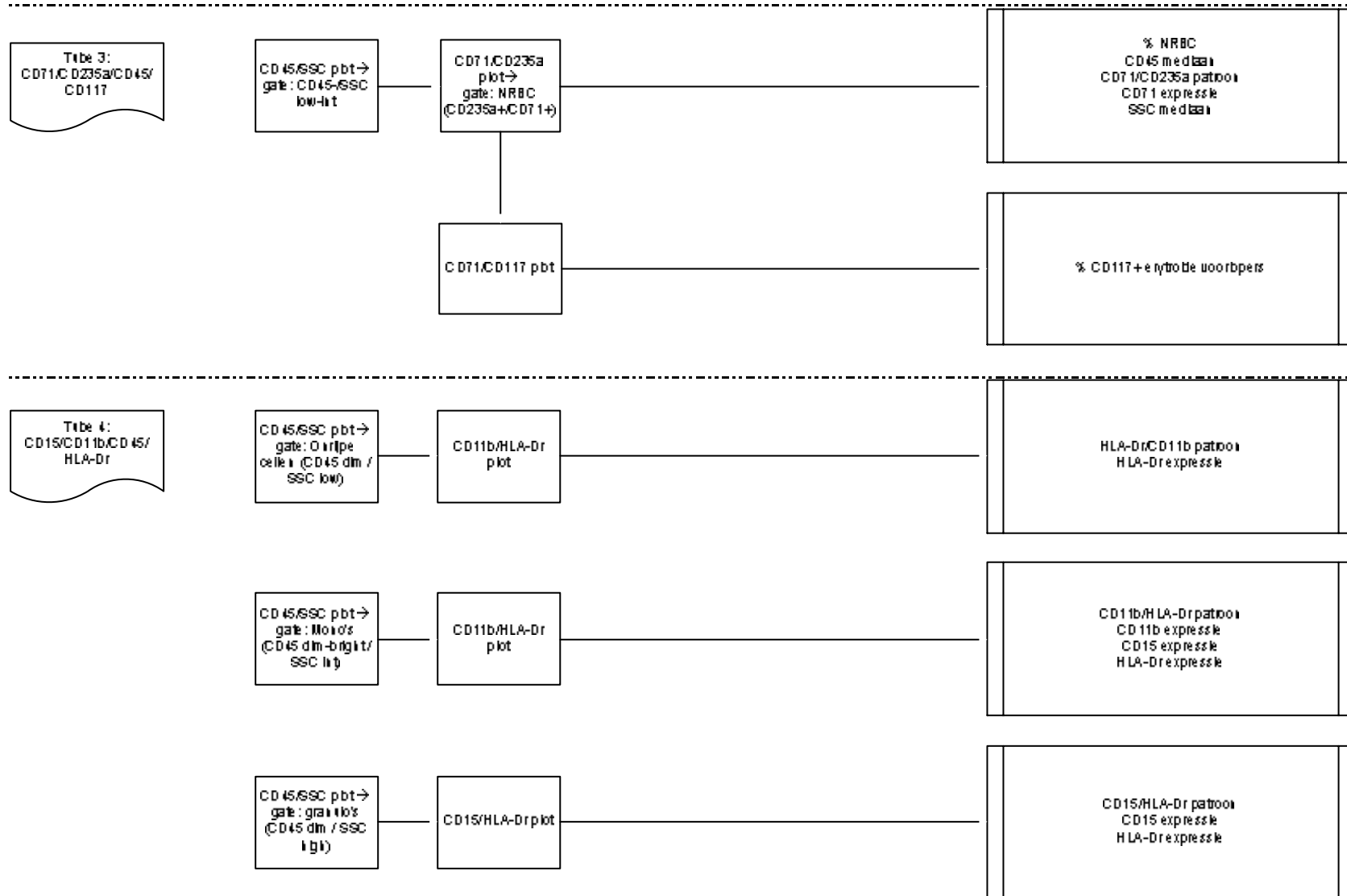
In de stroomschema's staat beschreven welk plots er gemaakt worden en vervolgens welke populaties gedefinieerd dienen te worden. Een pijl tussen de verschillende stappen geeft aan dat er verder wordt gewerkt met de geselecteerde populatie.

Voor het bepalen van de achtergrond van de verschillende fluorochromen en eventuele autofluorescentie, wordt er gebruik gemaakt van de PBS buis (antistofcombinatie 1).

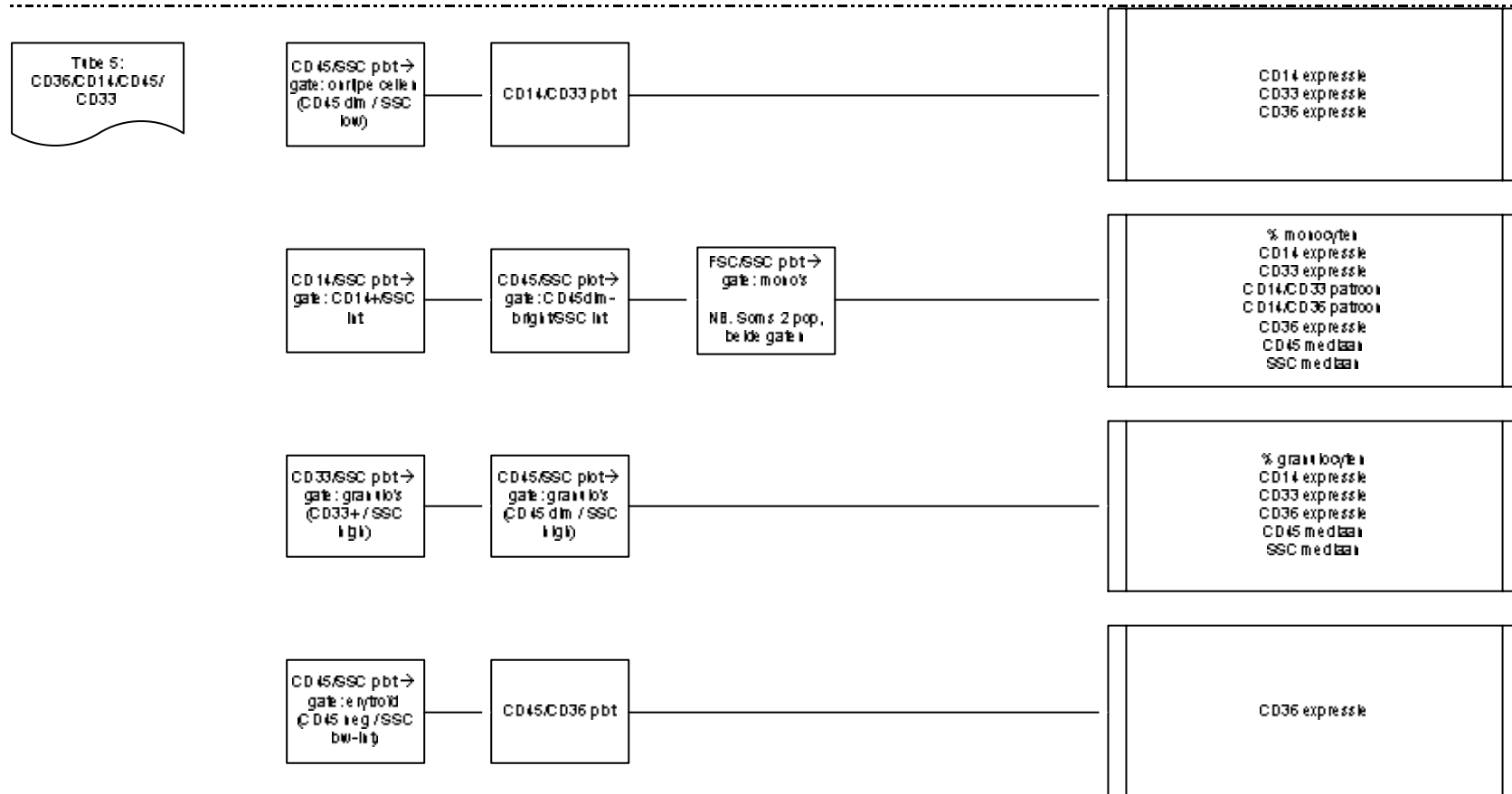
# 'Flowcytometrie bij MDS'



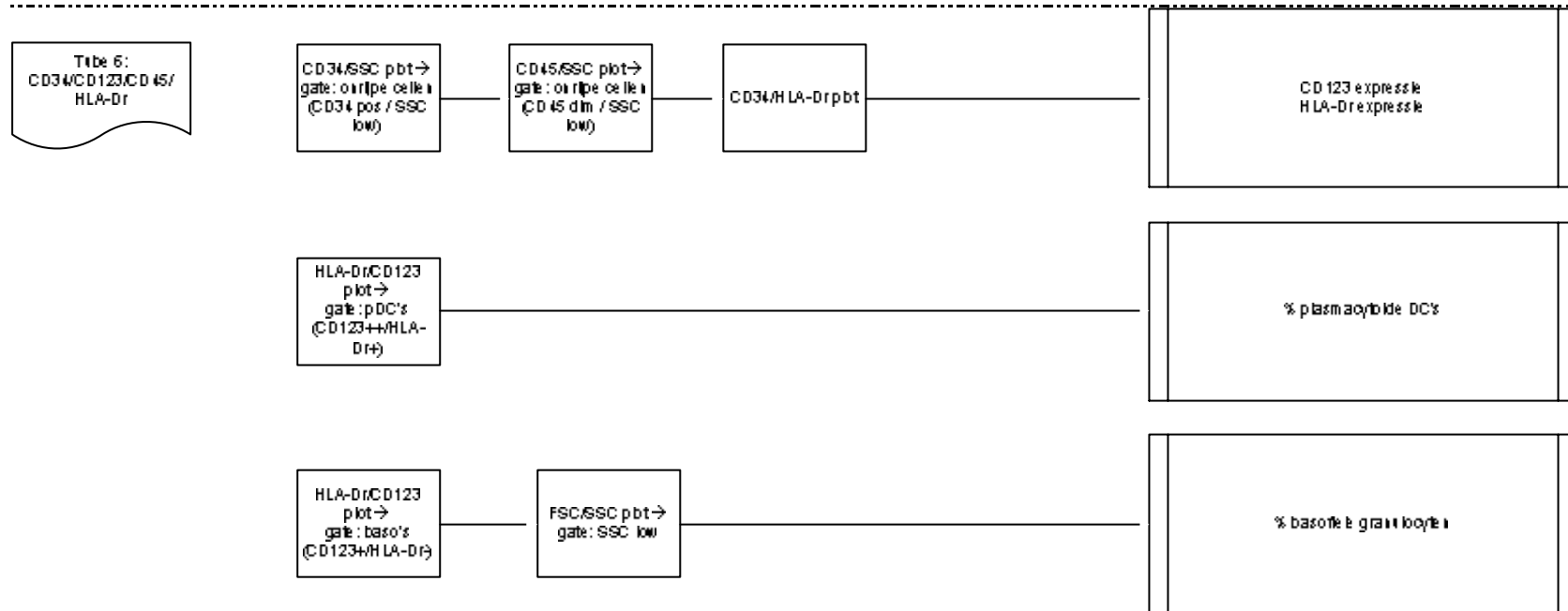
# 'Flowcytometrie bij MDS'



# 'Flowcytometrie bij MDS'

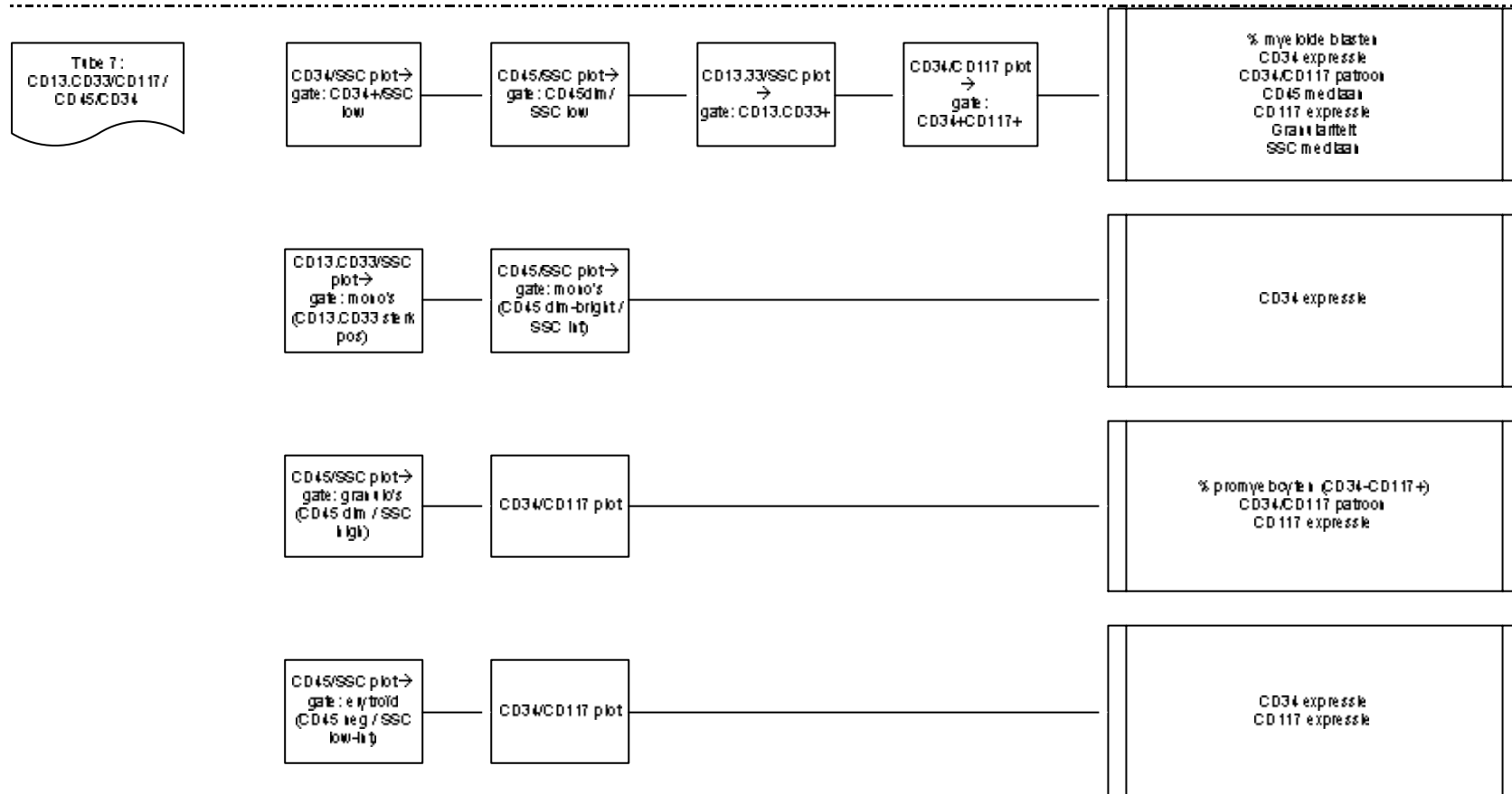


# 'Flowcytometrie bij MDS'

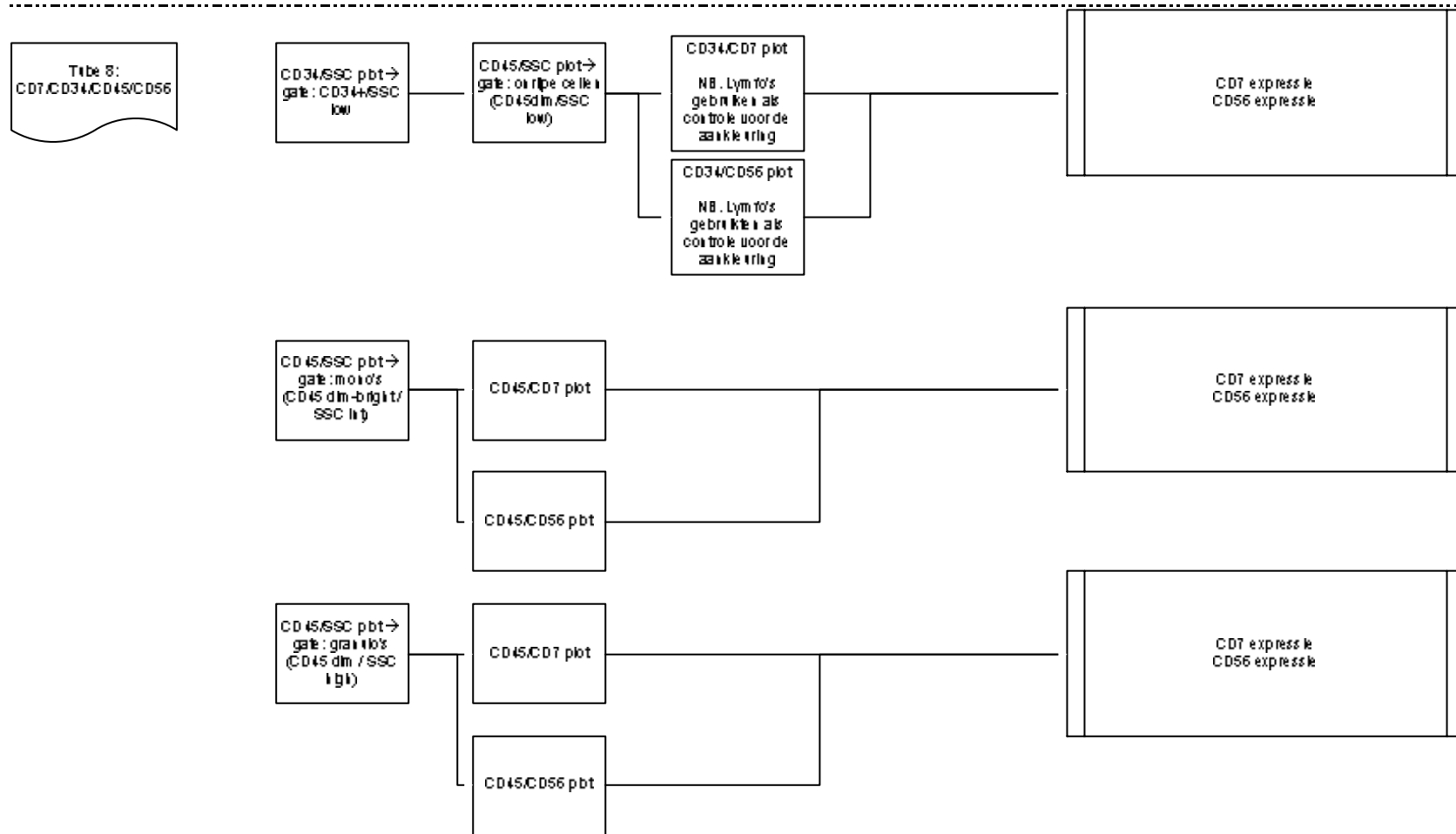




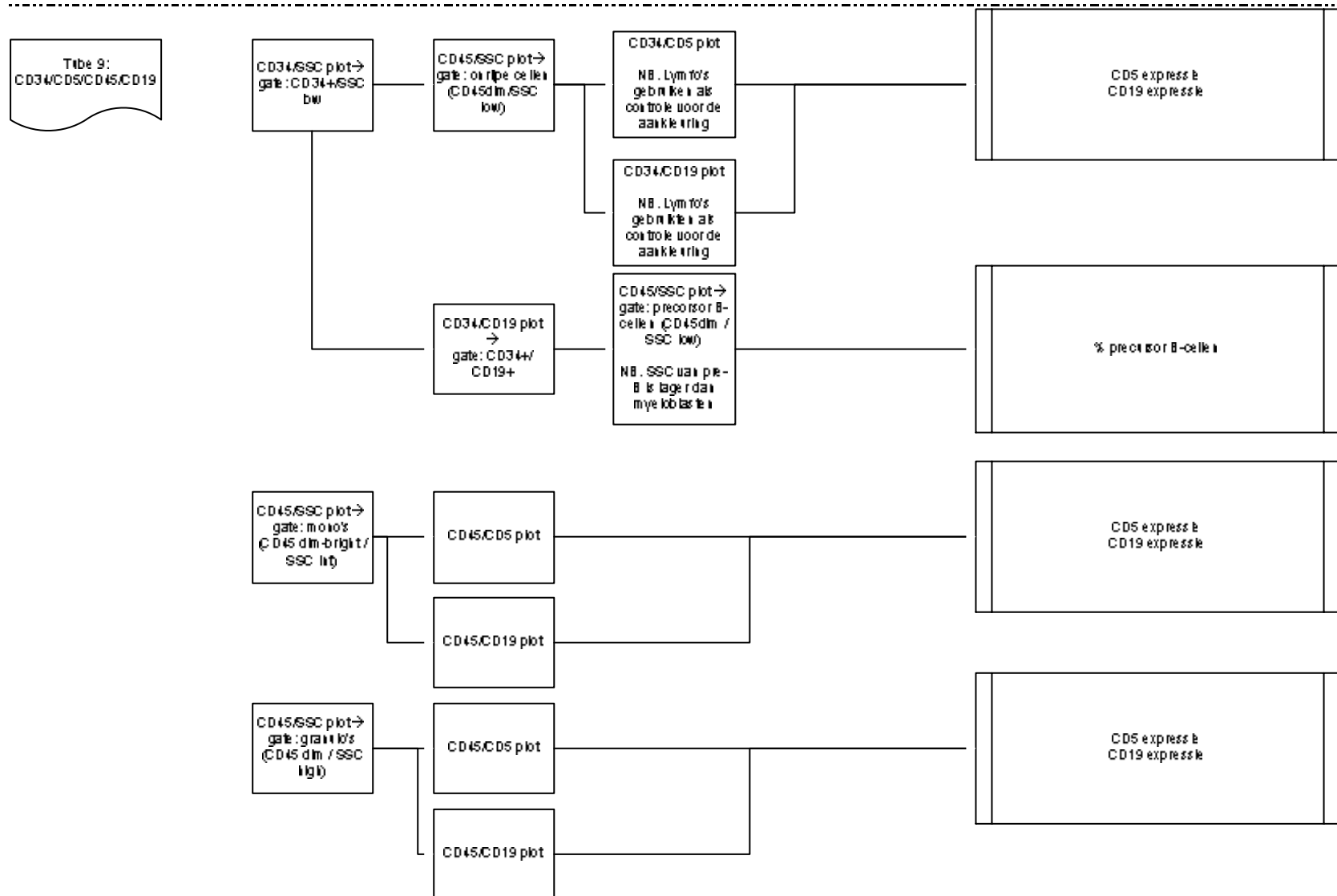
# 'Flowcytometrie bij MDS'



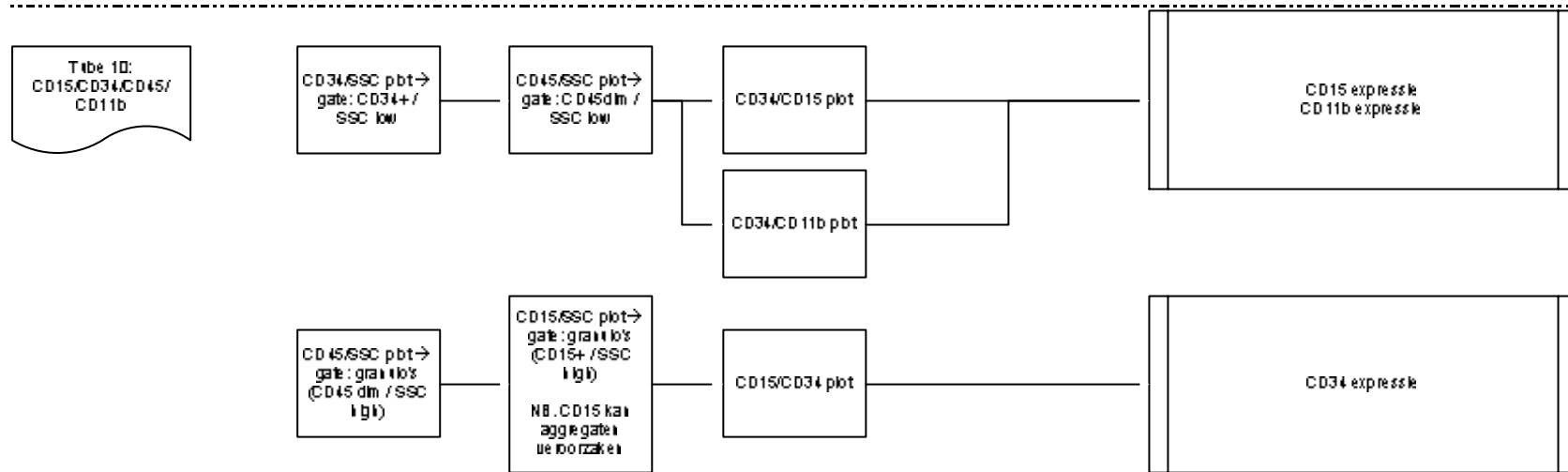
# 'Flowcytometrie bij MDS'



# 'Flowcytometrie bij MDS'



# 'Flowcytometrie bij MDS'



## Definities celpopulaties

Subpopulatie	Definitie
Erytroïde voorlopers	CD45 <sup>+</sup> ; CD235a <sup>+</sup> ; CD71 <sup>+</sup> ; SSC <sup>low</sup>
Myeloblasten	CD45 <sup>dim</sup> ; SSC <sup>low</sup> ; CD34 <sup>+</sup> ; CD117 <sup>+</sup> ; CD13 en/of CD33 <sup>+</sup>
Granulocyten	CD33 <sup>+</sup> ; SSC <sup>high</sup> ; backgating CD45/SSC
Monocyten	CD14 <sup>+</sup> ; backgating CD45/SSC
Lymfocyten	CD45 <sup>bright</sup> ; SSC <sup>low</sup>
Precursor B-cellen	CD45 <sup>dim</sup> ; SSC <sup>low</sup> ; CD34 <sup>+</sup> ; CD19 <sup>+</sup>
Plasmacytoïde DC's	CD123 <sup>+</sup> ; HLA-Dr <sup>++</sup>
Basofiele granulocyten	CD123 <sup>+</sup> ; HLA-Dr <sup>-</sup> ; SSC <sup>low</sup>
Promyelocyten	CD34 <sup>+</sup> ; CD117 <sup>+</sup> ; SSC <sup>high</sup>

Deze subpopulaties worden weergegeven als % van de kernhoudende cellen inclusief kernhoudende cellen van de erytroïde reeks.

### Opmerkingen:

#### *Monocyten:*

Indien hypogranulaire granulocyten het gaten van monocyten in de CD45/SSC plot bemoeilijken, kan de CD33 aankleuring gebruikt worden om granulocyten en monocyten te onderscheiden (respectievelijk zwakke en sterke CD33 expressie). Een andere mogelijke merker voor het bepalen van het percentage monocyten is CD64. Echter is deze merker nog niet opgenomen in de verschillende antistofcombinaties.

Indien het materiaal ouder wordt kan er sprake zijn van twee populaties monocyten in een FSC/SSC plot. Beide dienen meegenomen te worden bij de analyse van de monocyten.

#### *Precursor B-cellen*

Deze cellen worden gegate op het criterium CD34<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> en SSC low. Echter CD19 kan ook als aberrante merker tot expressie gebracht worden op myeloblasten. In dit geval kan de SSC en CD45 expressie onderscheid maken tussen myeloblasten en precursor B-cellen. De myeloblasten populatie heeft een hogere SSC dan de precursor B-cellen.

#### *CD33 polymorfisme*

Er is een CD33 polymorfisme beschreven. Dit betekent dat CD33 op alle betrokken cellijnen (myeloblasten, granulocyten en monocyten) zwakker tot expressie gebracht wordt. De verhoudingen in CD33 expressie tussen de verschillende subpopulaties blijft echter wel gelijk.

#### *Aggregaat vorming bij CD15 aankleuring*

De beschikbare CD15 antistoffen hebben een IgM isotype. Hierdoor kan er sprake zijn van aggregaat vorming tijdens de antistofincubatie. Uittitratie kan aggregaat vorming verminderen.

#### *Eosinofiele granulocyten*

Voor een juiste interpretatie van de granulocyten dienen de eosinofiele granulocyten uitgesloten te worden bij analyse. De eosinofiele granulocyten kunnen uitgegate worden met behulp van het volgende criterium: CD11b<sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup>, FSC<sup>low</sup>.

## 'Flowcytometrie bij MDS'

### *CD34 negatieve blasten*

Het percentage blastaire cellen wordt bepaald aan de hand van de CD34 aankleuring. Men dient altijd alert te blijven op CD34 negatieve aberrante blasten.

### *CD45 negatieve blasten*

CD45 kan aberrant afwezig zijn op myeloïde blasten.

## **Interpretatie van de data**

### *Aberrante merker expressie*

Een merker wordt aberrant gescoord indien meer dan 10% van de cellen (i.e. = 25 events) deze merker tot expressie brengt.

### *Over- en onderexpressie van de markers*

Over- en onderexpressie wordt beoordeeld aan de hand van de Mean Fluorescence Intensity (MFI) van de normale beenmergen. Indien er meer dan een halve log verschil is ten opzichte van de normale aankleuring wordt de over- of onderexpressie gescoord. Een halve log verschil is te berekenen met een factor 3,3.

Voor het beoordelen van de overexpressie op CD56 op monocytten wordt 1 log verschil aangehouden. CD56 kan ook tot expressie gebracht worden op geactiveerde monocytten.

### *Ratio's ten opzichte van de lymfocyten.*

Om de granulariteit en de CD45 expressie te scoren wordt de SSC mediaan en de CD45 mediaan van de verschillende populaties gedeeld door de mediaan van de lymfocyten. De lymfocyten zijn veelal niet aangedaan bij een MDS en kunnen om deze reden als noemer gebruikt worden bij het berekenen van de ratio's.

### *Beoordeling van uitrijpingspatronen*

Indien er sprake is van een toename van een leukocyten subset dient het aantal events bij de beoordeling van de uitrijpingspatronen aangepast te worden aan het aantal events in het referentie plot (normale beenmergen), zoals maximaal 20.000 granulocyten in een te beoordelen granulocyten differentiatiepatroon.

'Flowcytometrie bij MDS'

Bijlage 1: Scoreformulier flowcytometrie

naam		MDS flowcytometrie			
reg.nr.					
pt.nr.		datum			
Differentiatie	ery CD71+235a+	myeloblast* CD34+117+13+33+	granulo* CD33+45+SSC	mono* CD14+45+SSC	lymfo* CD45+SSC
<b>percentage</b> (*in leukocytenfractie)					
ratio tov lymfocyten	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX		XXXXXXXXXX
Expressie	ery	myeloblast	granulo	mono	lymfo
<i>algemene parameters</i>					
SSC (mediaan)					
SSC ratio tov lymfocyten					XXXXXXXXXX
CD45 (mediaan)					
CD45 ratio tov lymfocyten					XXXXXXXXXX
<i>specifieke parameters</i>					
	intensiteit / %	intensiteit / %	intensiteit / %	intensiteit / %	XXXXXXXXXX
CD11b	XXXXXXXXXX	/	/	/	XXXXXXXXXX
CD13	XXXXXXXXXX	/	/	/	XXXXXXXXXX
CD14	XXXXXXXXXX	/	/	/	XXXXXXXXXX
CD15	XXXXXXXXXX	/	/	/	XXXXXXXXXX
CD16	XXXXXXXXXX	/	/	/	XXXXXXXXXX
CD33	XXXXXXXXXX	/	/	/	XXXXXXXXXX
CD34	/	/	/	/	XXXXXXXXXX
CD36	/	/	/	/	XXXXXXXXXX
HLA-DR	XXXXXXXXXX	/	/	/	XXXXXXXXXX
CD117	/	/	/	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
CD123	XXXXXXXXXX	/	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
CD71	/	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
CD235a	/	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>lineage infidelity parameters</i>					
CD5	XXXXXXXXXX	/	/	/	XXXXXXXXXX
CD7	XXXXXXXXXX	/	/	/	XXXXXXXXXX
CD19	XXXXXXXXXX	/	/	/	XXXXXXXXXX
CD56	XXXXXXXXXX	/	/	/	XXXXXXXXXX
Relatie tussen markers *	ery	myeloblast	granulo	mono	lymfo
CD34 / CD117				XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
CD11b / CD13	XXXXXXXXXX			XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
CD16 / CD13	XXXXXXXXXX			XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
CD11b / CD16	XXXXXXXXXX			XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
HLA-DR / CD11b	XXXXXXXXXX		XXXXXXXXXX		XXXXXXXXXX
CD15 / HLA-DR	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX		XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
CD14 / CD33	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX		XXXXXXXXXX
CD14 / CD36	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX		XXXXXXXXXX
CD71 / CD235a		XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
CD117 / CD71		XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
* normaal patroon: 0, afwijkend patroon: 1					
<b>Overige</b>					
% precursor B-cellen (CD45dimCD34+19+SSC <sup>low</sup> )			<b>Morfologie</b>		XXXXXXXXXXXXXXXXXX
% basofiele granulocyten (CD123+HLA-DR-)			<b>Cytogenetica</b>		XXXXXXXXXXXXXXXXXX
% plasmacytoïde DC (CD123++HLA-DR+)					
% promyelocyten (CD34-CD117+)			<b>MDS flow-score</b>		XXXXXXXXXXXXXXXXXX

**LITERATUUR VERWIJZINGEN**

Kraan et al. Setting up and calibration of a flow cytometer for multicolor immunophenotyping. *J Biol Regul Hemeost Agents* 2003; 17:223-233

Westers et al. Implementation of Flow Cytometry in the Diagnostic Work-Up of Myelodysplastic Syndromes (MDS) in a multicentre approach: Report from the Dutch Working Party on Flow Cytometry in MDS. *Cytometry* 2011; submitted

Van de Loosdrecht et al. Standardization of flow cytometry in MDS: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009; 94: 1124-1134

Ogata et al. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34<sup>+</sup> cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood* 2006; 108(3): 1037-1044

Wells et al. Myeloid and monoytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003; 102(1): 394-403

Stetler-Stevenson et al. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2001; 98(4): 979-987

Van Lochem et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom.* 2004; 60(1): 1-13

Stachurski et al. Flow cytometric analysis of myelomonocytic cells by a pattern recognition approach is sensitive and specific in diagnosing myelodysplastic syndrome and related marrow diseases: emphasis on a global evaluation and recognition of diagnostic pitfalls. *Leuk Res.* 2008; 32(2): 215-224

Kern et al. Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic syndrome: correlation to cytomorphology, cytogenetics, and clinical data. *Cancer* 2010; 116(19): 4549-4563

Matarraz et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34<sup>+</sup> hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008; 22(6): 1175-1183