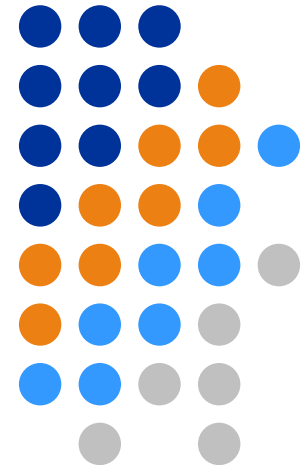


Flowcytometrie in MDS

Marisa Westers

VU  **Hematologie** Amsterdam



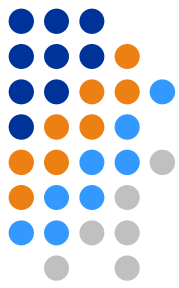


Standaardisatie van flowcytometrie in MDS

2005 start werkgroep “Flow in MDS” binnen de Nederlandse Vereniging voor Cytometrie

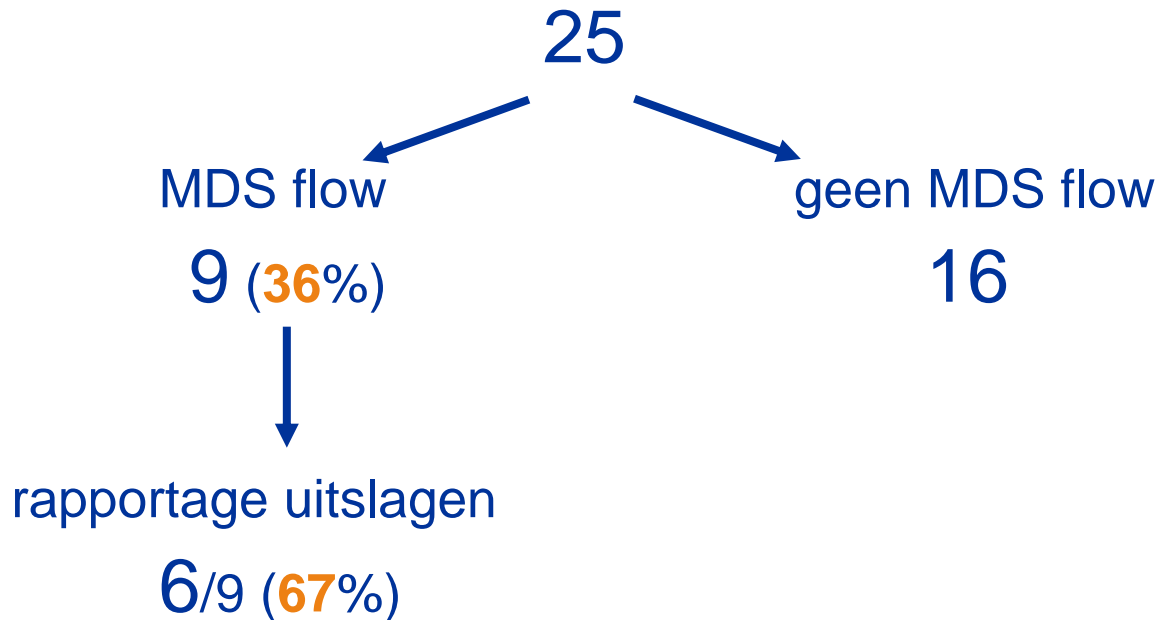
8 deelnemende laboratoria

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



Flowcytometrie in MDS in NL en België

- 46 centra ingeschreven voor de workshop (incl. 8 van de werkgroep)
- respons op enquête 66% (excl. werkgroep)

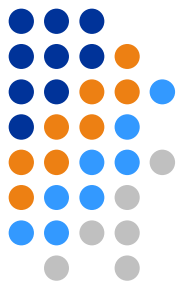




Standaardisatie van flowcytometrie in MDS

16 bijeenkomsten vanaf 2005-...

- overzicht van literatuur
- criteria geformuleerd voor analyse van MDS beenmergmonsters m.b.v. flowcytometrie
- richtlijnen opgesteld voor
 - definities van subpopulaties
 - een panel van antistoffen bestaande uit erythroïde, myelomonocytaire en lymfatische markers
 - instrument settings
 - de te scoren FCM aberranties



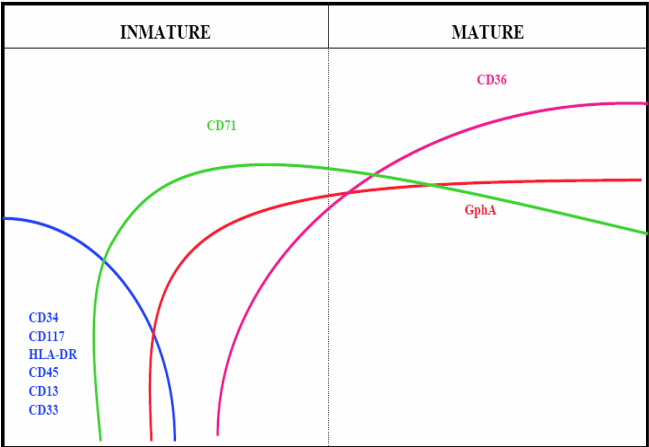
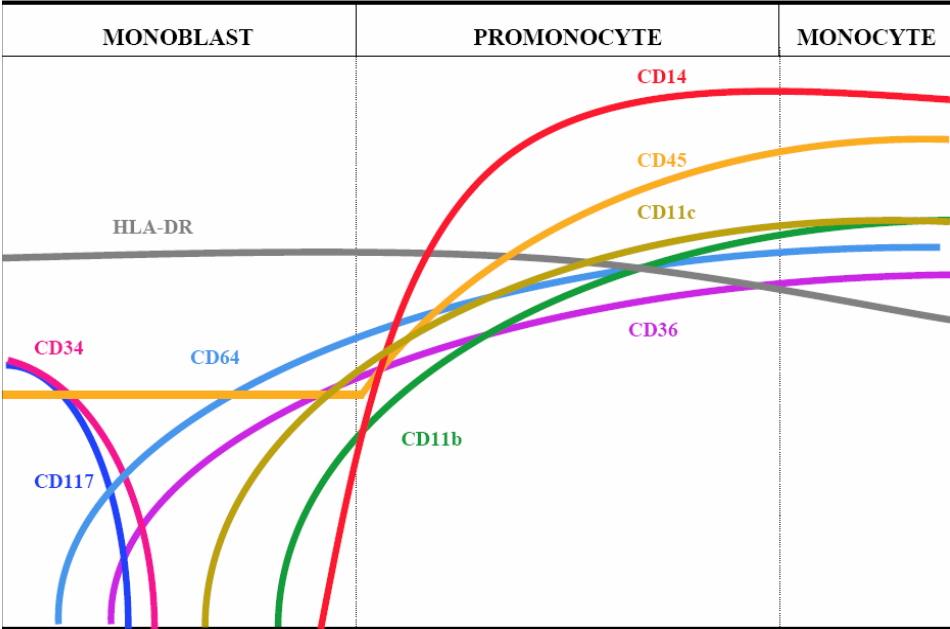
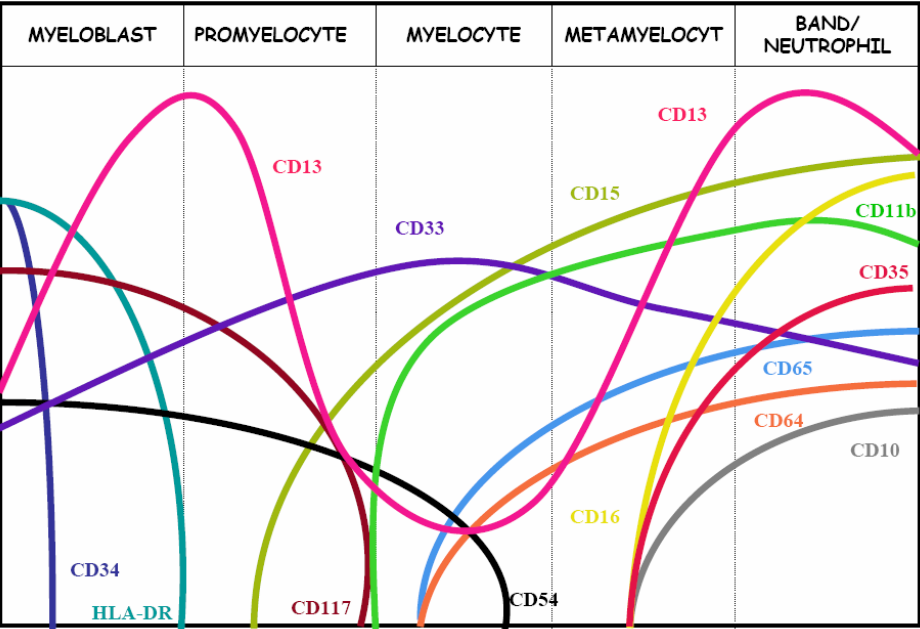
Te analyseren celpopulaties in MDS

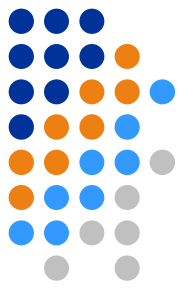
- erythroïde reeks
- myelomonocytair reeks
 - myeloïde voorlopercellen
 - granulocyten
 - monocyten
- voorloper B-cellen

NB! Megakaryocyten aantal te laag en te weinig antistoffen beschikbaar voor betrouwbare analyse

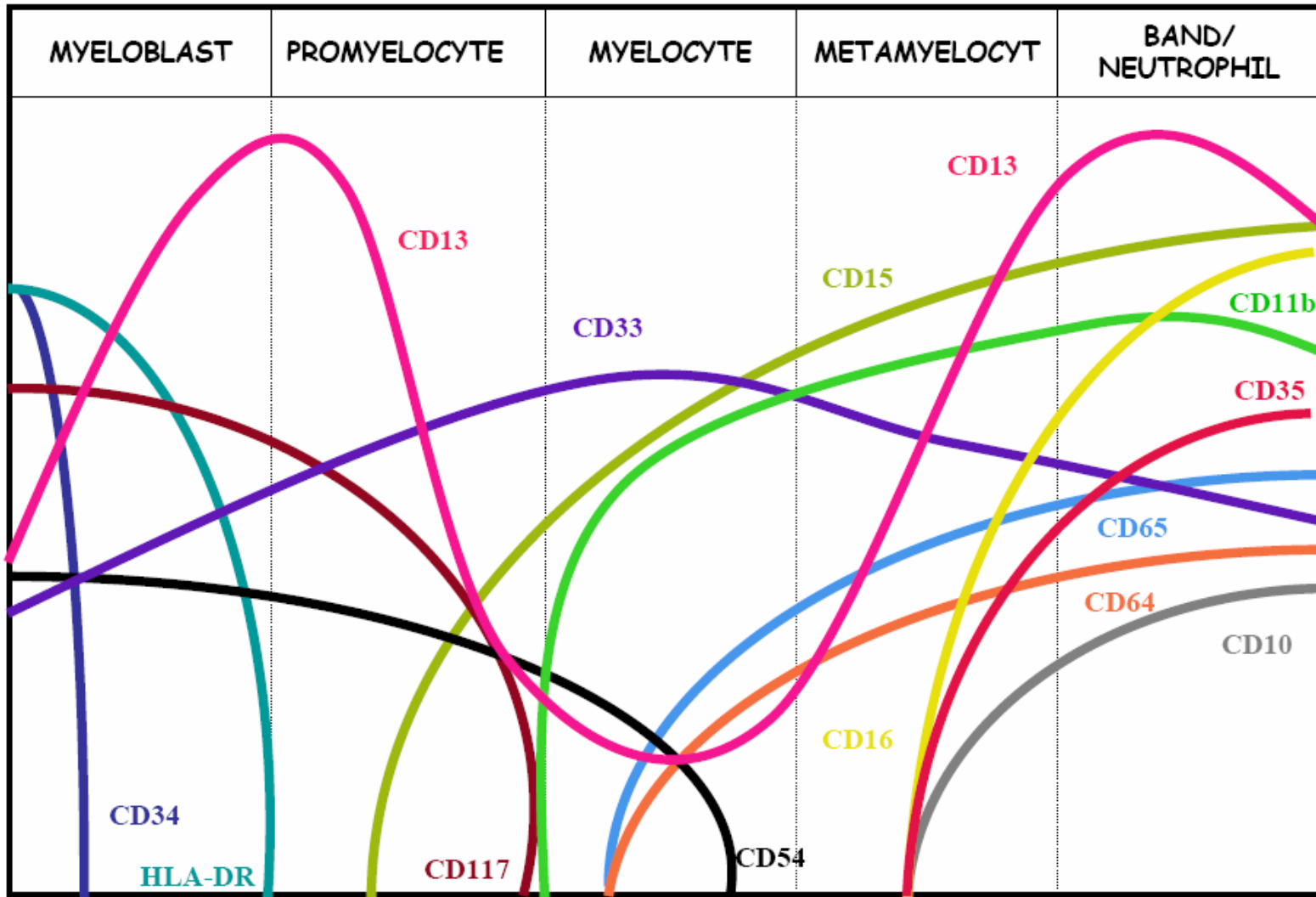


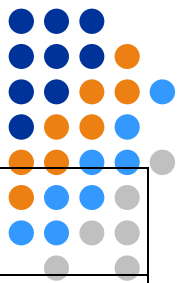
Normale antigeen-expressie tijdens maturatie





Normale antigen-expressie tijdens granulocytenmaturing





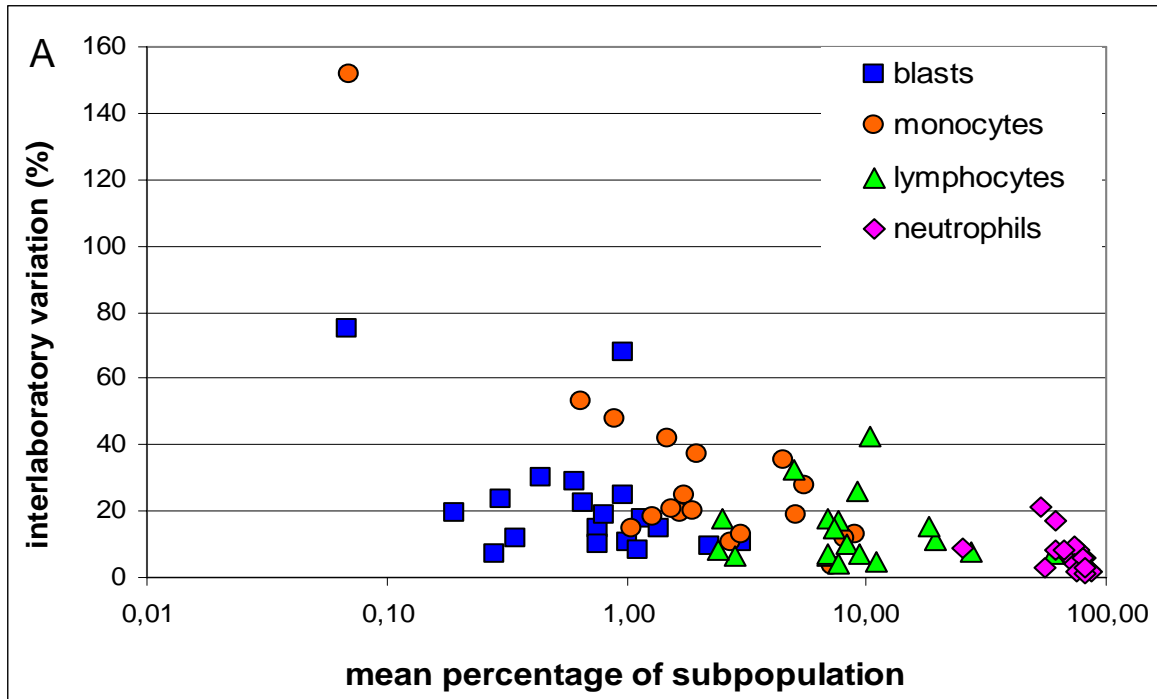
(Her)definities van subpopulaties

Sub population	Definition
Nucleated red cells	CD45 ⁻ CD235a ⁺ CD71 ⁺ SSC ^{low}
Myeloblasts	CD45 ^{dim} SSC ^{low} CD34 ⁺ CD117 ⁺ in combination with a myeloid marker (CD13, CD33) or CD45 ^{dim} SSC ^{low} CD117 ⁺ HLA-DR ⁺ CD11b ⁻ (2008)
Maturing neutrophils	CD33 ^{dim} back gated in CD45/SSC plot
Monocytes	CD64 ^{bright} and CD33 ^{bright} back gated in CD45/SSC plot; CD14 ⁺ on mature monocytes (2011)
Lymphocytes	CD45 ^{bright} SSC ^{low}
Precursor B cells	CD45 ^{dim} SSC ^{low} CD34 ⁺ CD19 ⁺
Plasmacytoid DC	CD123 ⁺ HLA-DR ⁺⁺ regardless of CD34 ⁺
Basophils	CD123 ⁺ HLA-DR ⁻ SSC ^{low}
Promyelocytes	CD34 ⁻ CD117 ⁺ CD34 ⁻ CD117 ⁺ SSC ^{high} (2008)

Interlaboratorium variatie in de FCM diff

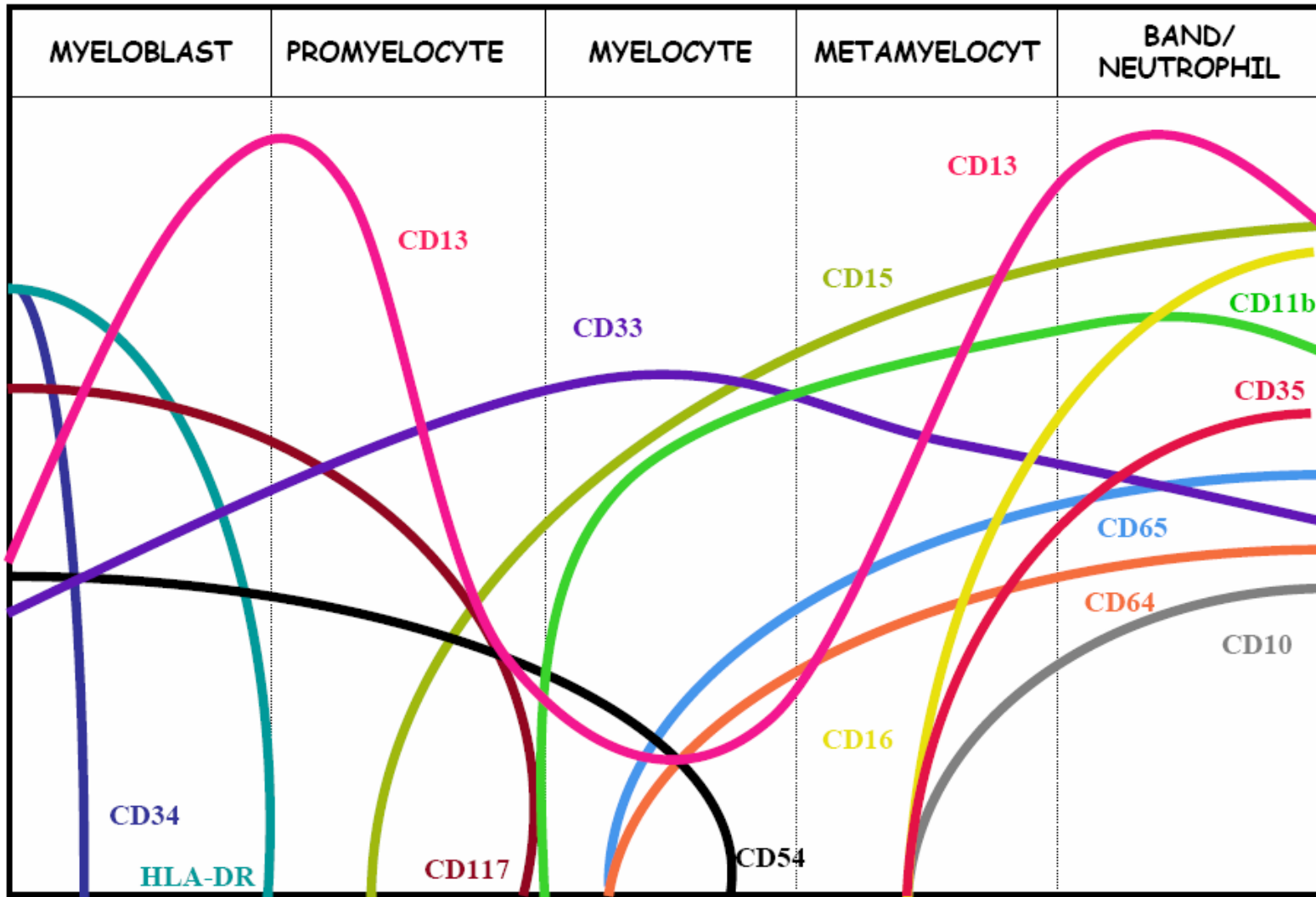


Analyse van de FCM diff (list mode data files)

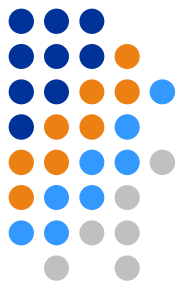




Normale antigen-expressie tijdens granulocytenmaturing



Voorgestelde antistofcombinaties voor analyse van MDS



tube					lineage
1	PBS	PBS	CD45	PBS	
2	CD235a	CD117	CD45	CD71	erythroid
3	CD16	CD13	CD45	CD11b	myelomonocytic
4	CD36	CD33	CD45	CD14	myelomonocytic
5	HLA-DR	CD15	CD45	CD11b	myelomonocytic
6	CD13+33	CD117	CD45	CD34	myelomonocytic
7	HLA-DR	CD123	CD45	CD34	immature/basophilic/DC
8	CD7	CD56	CD45	CD34	immature/lymphocytes
9	CD5	CD19	CD45	CD34	immature/lymphocytes
10*	CD15	CD11b	CD45	CD34	myelomonocytic

NB! Geen beperking in de te gebruiken antistofklonen, fluorochromen en xx-kleurenfluorescentie



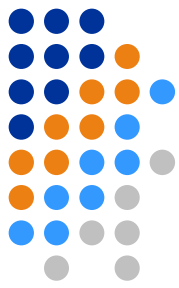
Standaardisatie van flowcytometrie in MDS

16 bijeenkomsten vanaf 2005-...

- overzicht van literatuur
- criteria geformuleerd voor analyse van MDS beenmergmonsters m.b.v. flowcytometrie
- richtlijnen opgesteld voor
 - definities van subpopulaties
 - een panel van antistoffen bestaande uit erythroïde, myelomonocytaire en lymfatische markers
 - “instrument settings / “performance check”
 - de te scoren FCM aberranties

Standaardisatie van flowcytometrie in MDS

te scoren aberranties



Meest belangrijk:

- kennis van normale expressie(patronen) in normale beenmergen
- normale controles dienen van dezelfde leeftijd te zijn als de MDS-patiënten
- validatie van aberranties in pathologische controles of te wel welke afwijkingen zijn specifiek voor MDS
 - niet-clonale cytopenieën
 - chemotherapie
 - ...

Te scoren aberranties in de erytroïde reeks

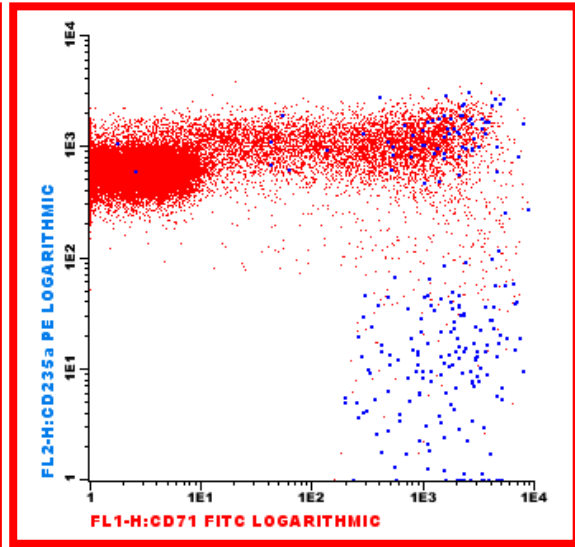
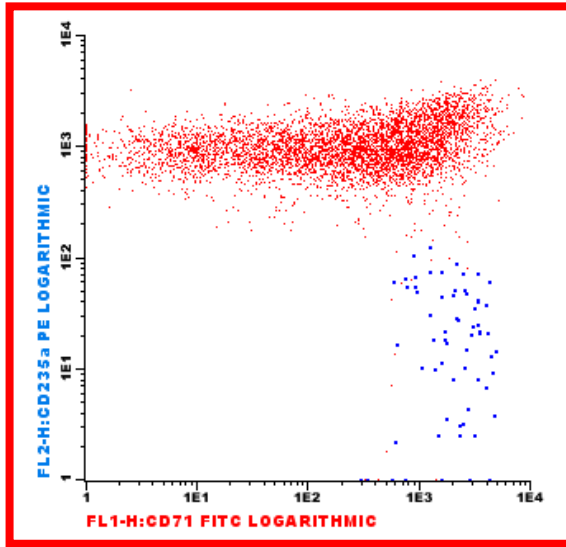
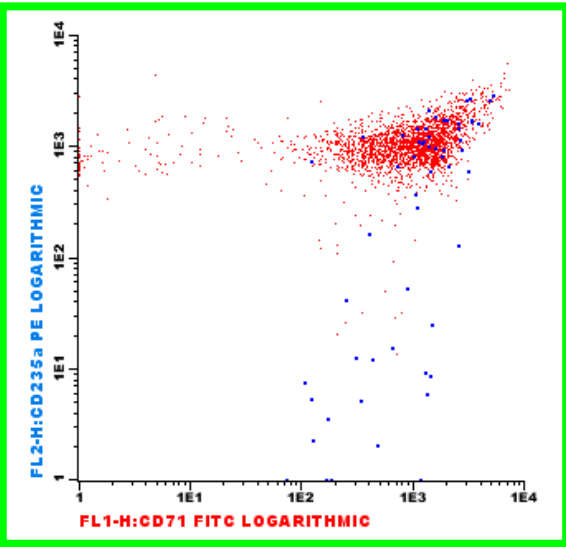


- % kernhoudende erytroïde cellen
- relatie en expressie van **CD71-CD235a**
- expressie van CD36
- expressie van CD34/**CD117**

Erytrodysplasie m.b.v. de flowcytometer



CD71 / CD235a / CD45 / CD117



selectie op CD45 negatieve cellen

Te scoren aberranties in de voorlopercel populatie

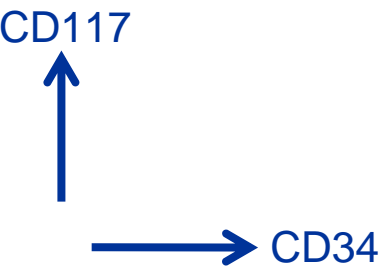
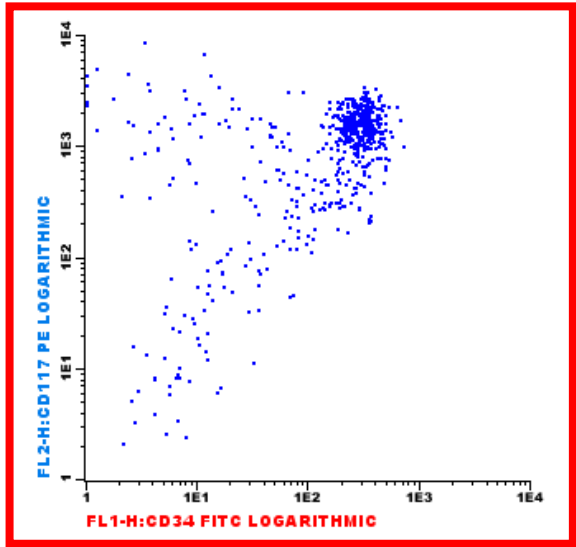
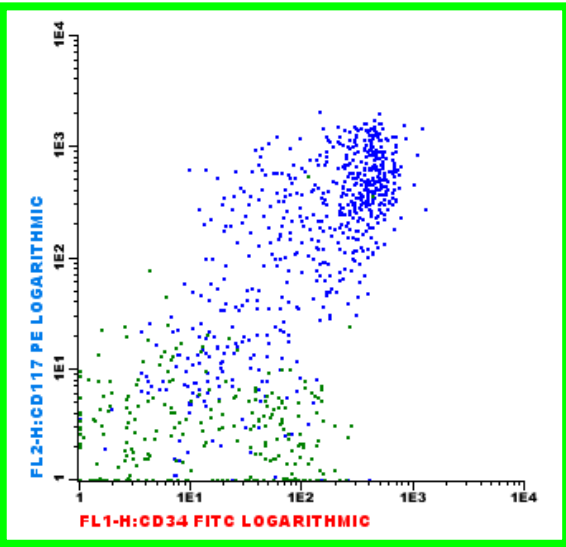


- % cellen in kernhoudende celfractie
- **expressie van CD45**
- **expressie van CD34**
- **expressie van CD117**
- **expressie van HLA-DR;**
- **expressie van CD13 and CD33**
- **asynchrone expressie van CD11b, CD15**
- **expressie van CD5, **CD7**, CD19, CD56**
- aantal voorloper B-cellen als fractie van de CD34+ populatie

Afwijkingen in de voorlopercelfractie m.b.v. de flowcytometer



CD34 / CD117 / CD45 / CD13+CD33

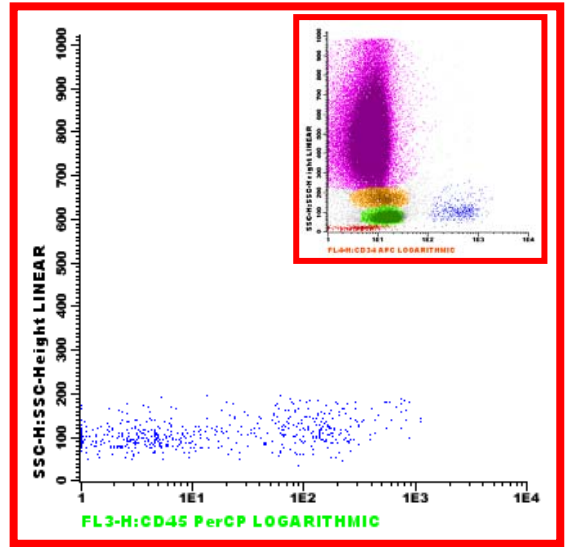
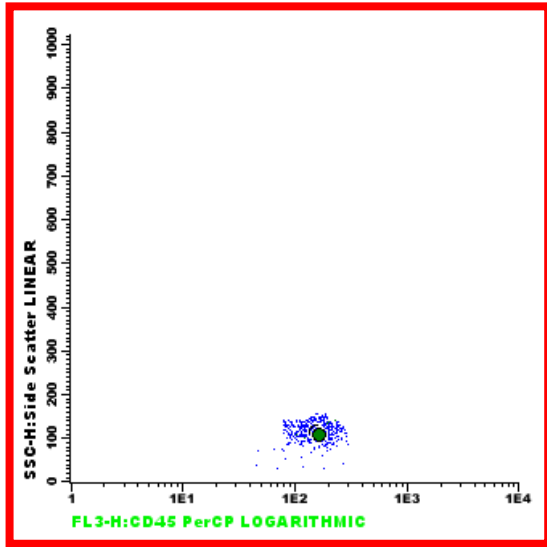
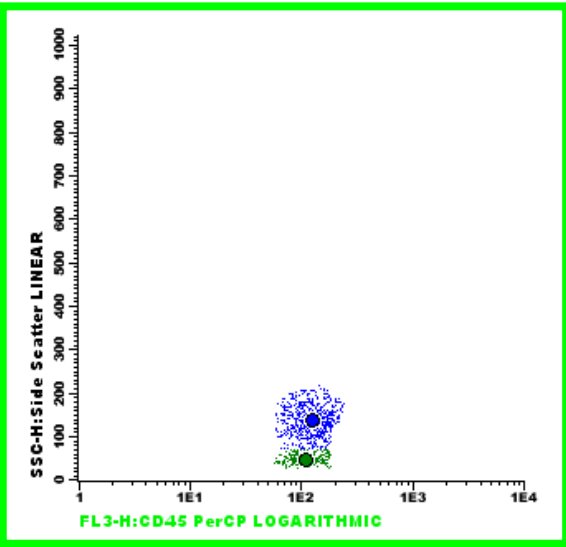


selectie op CD45^{dim} SSC^{low-int}

Afwijkingen in de voorlopercelfractie m.b.v. de flowcytometer



CD5 / CD19 / CD45 / CD34



SSC
↑

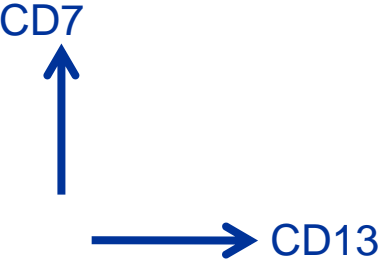
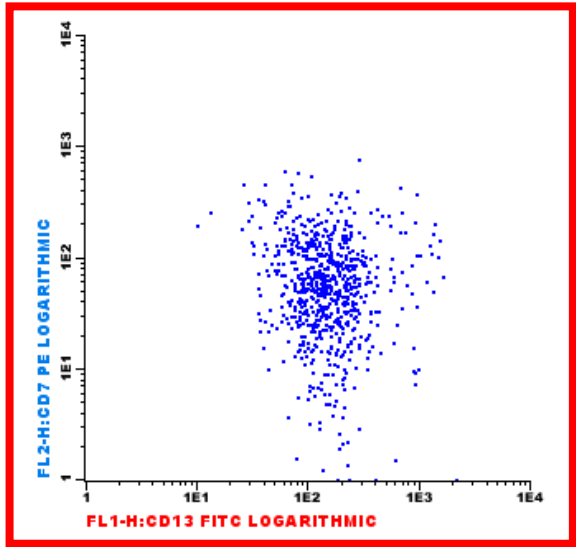
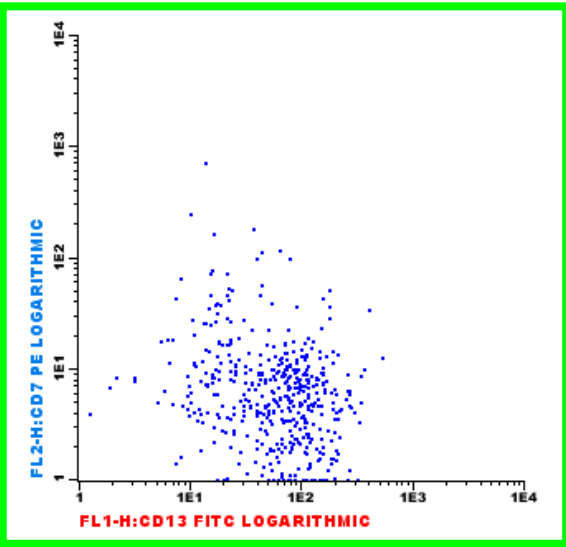
→ CD45

selectie op CD45^{dim} SSC^{low-int}

Afwijkingen in de voorlopercelfractie m.b.v. de flowcytometer



CD13 / CD7 / CD45 / CD34



selectie op CD45^{dim} SSC^{low-int} CD34⁺

Te scoren aberranties in de granulocytensubpopulatie

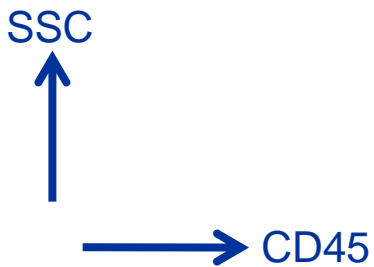
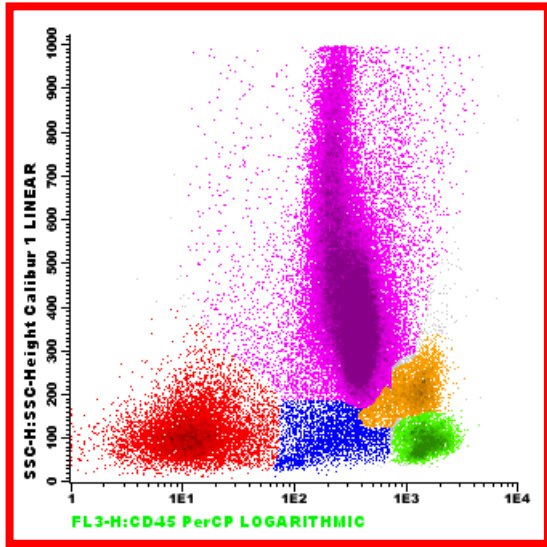
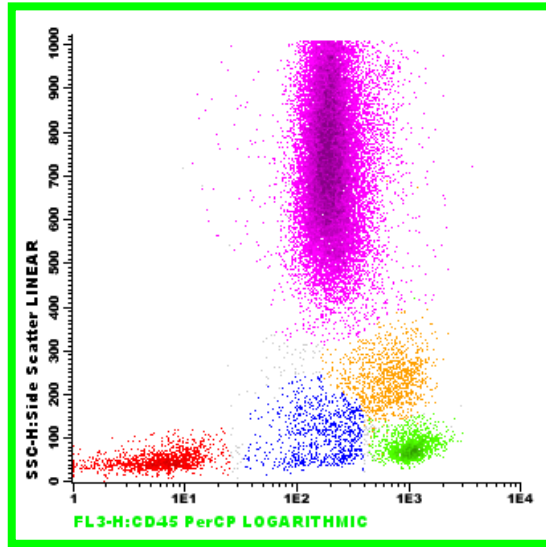


- % cellen als ratio t.o.v. lymfocyten
- **SSC als ratio t.o.v. SSC van lymfocyten**
- relatie van CD13 en CD11b
- **relatie van CD13 en CD16**
- expressie van CD33

Granulocytenanalyse m.b.v. de flowcytometer



- / - / CD45 / -

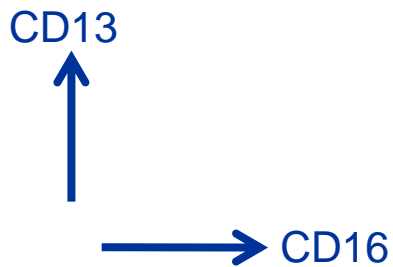
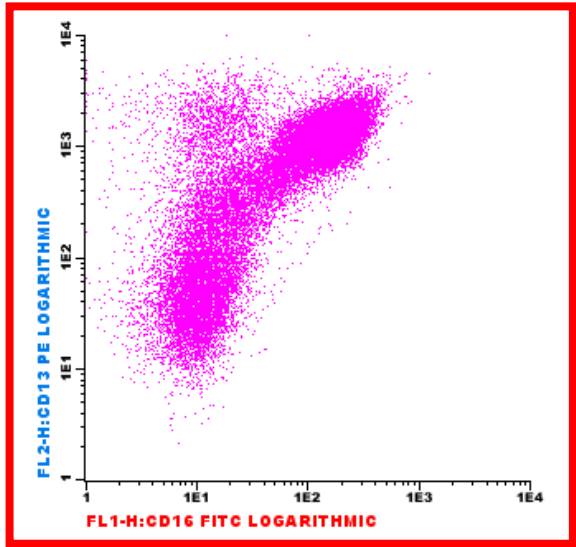
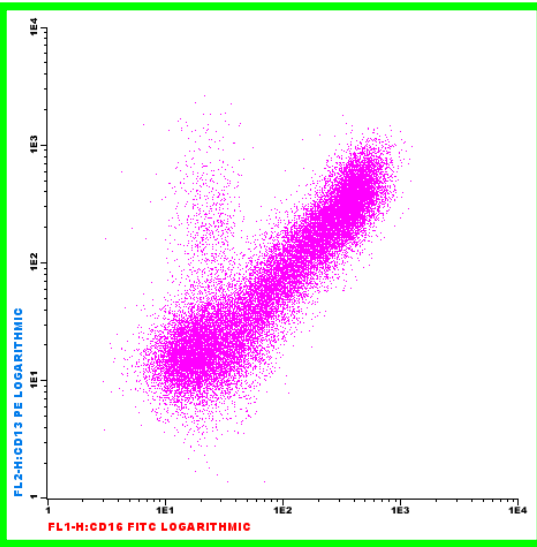


selectie op CD45dim SSC^{int-high}

Granulocytenanalyse m.b.v. de flowcytometer



CD16 / CD13 / CD45 / CD11b



selectie op CD45dim SSC^{int-high}

Te scoren aberranties in de monocytensubpopulatie

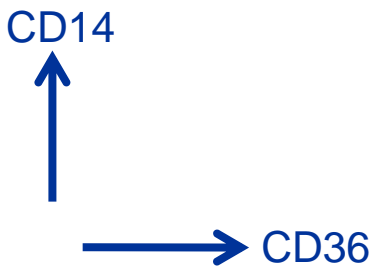
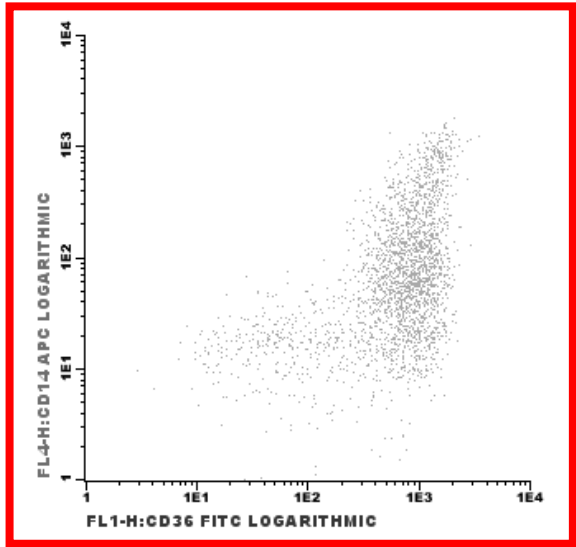
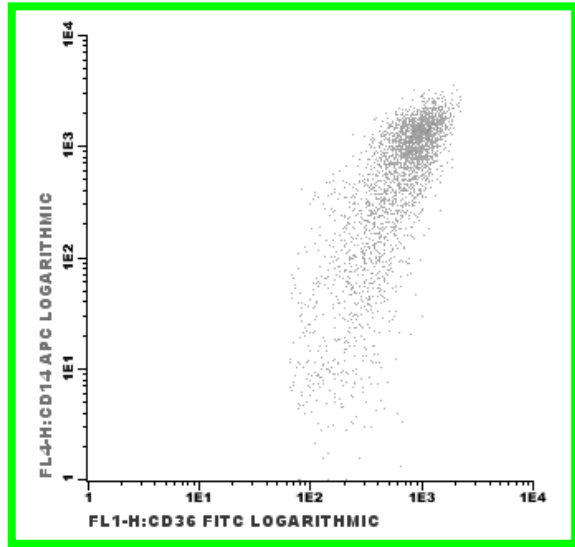


- % cellen als ratio t.o.v. lymfocyten
- relatie van CD36 en CD14
- relatie van HLA-DR en CD11b
- expressie van CD13 en CD33
- **over**expressie van CD56

Monodysplasie m.b.v. de flowcytometer



CD36 / CD33 / CD45 / CD14

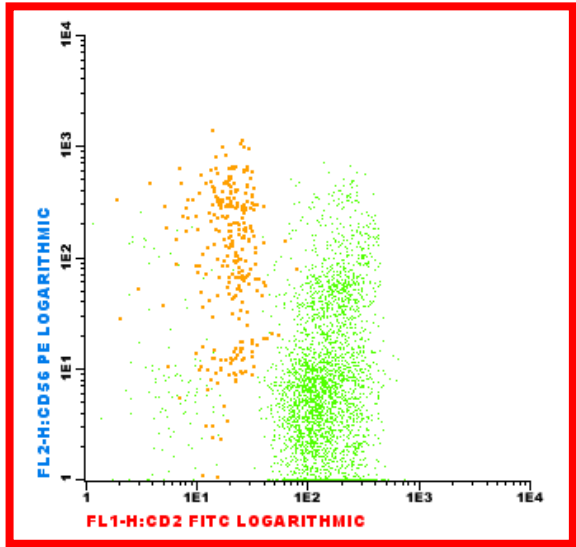
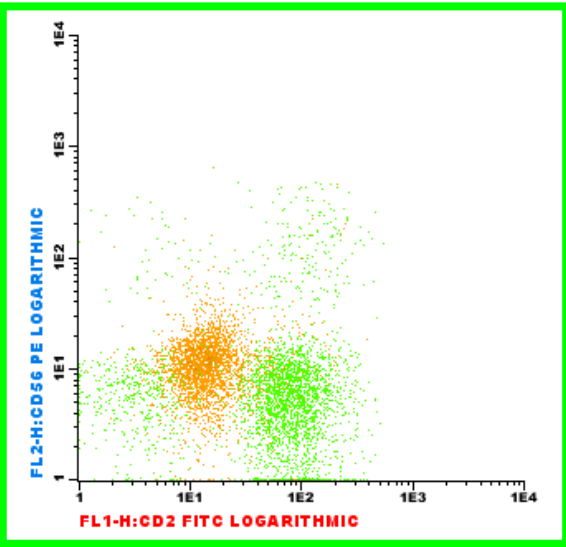


selectie op CD45^{int} SSC^{int}

Monodysplasie m.b.v. de flowcytometer



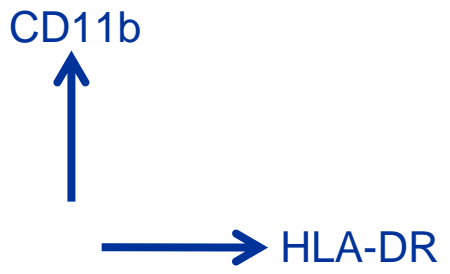
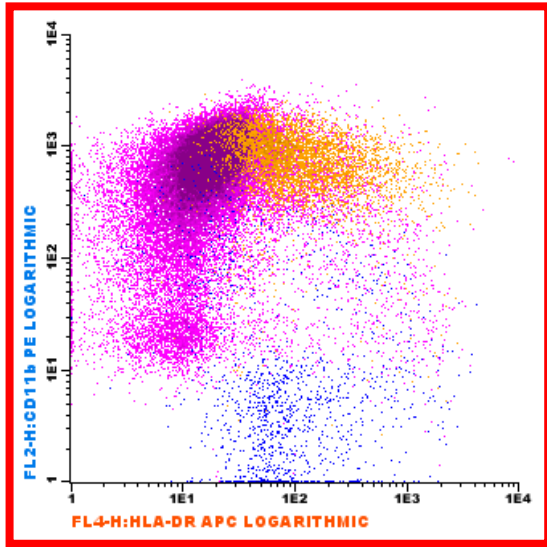
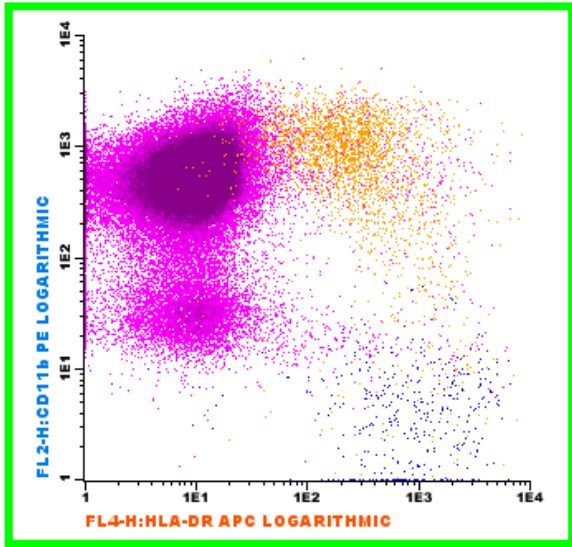
CD2 / CD56 / CD45 / CD34

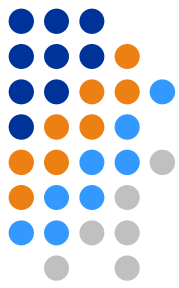


selectie op CD45^{int} SSC^{int}

Myelodysplasie m.b.v. de flowcytometer

CD34 / CD11b / CD45 / HLA-DR

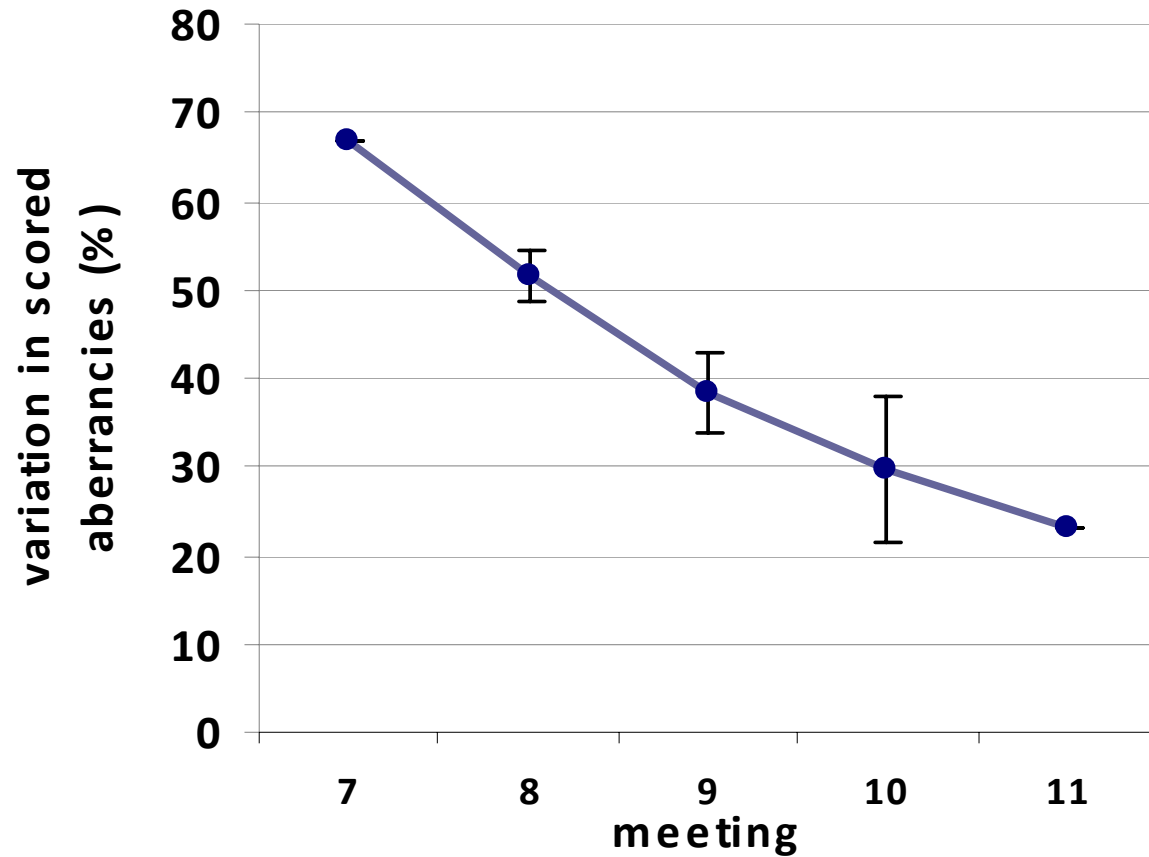




Standaardisatie van flowcytometrie in MDS

- richtlijnen opgesteld voor
 - definities van subpopulaties
 - een panel van antistoffen bestaande uit erythroïde, myelomonocytair en lymfatische markers
 - instrument settings
 - de te scoren FCM aberranties
- implementatie van deze richtlijnen werd geëvalueerd door
 - analyse van elektronische data files (n=20)
 - analyse van verse beenmergmonsters (n=3)
- richtlijnen werden n.a.v. discussies and recente literatuur

“The learning curve ...”



Flowcytometrie in de diagnose van MDS volgens WHO 2008

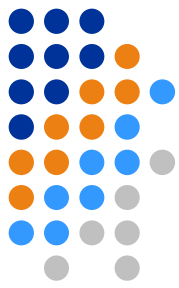


- % blasten
 - beïnvloed door
 - myelofibrose
 - hemodilutie
- abnormaal fenotype van CD34⁺ cellen als teken van dysplasie
- aberrante maturatie patronen: erytroid, granulocytair, monocytair

resultaten van flowcytometrie zouden kunnen wijzen op MDS bij 3 of meer aberranties;

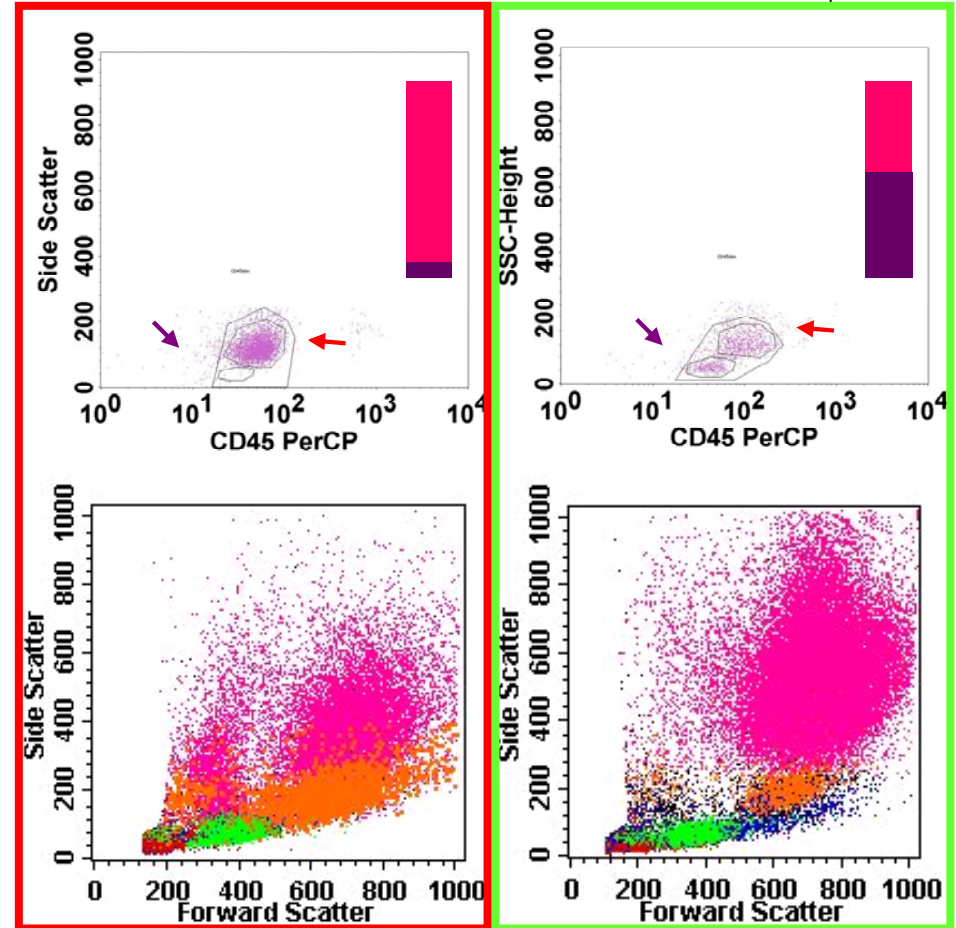
positieve flow moet opnieuw worden geëvalueerd na een aantal maanden voor MDS-classificerende morfologie en cytogenetica

Multicentrum studie naar de diagnose van MDS m.b.v. flowcytometrie



CD34 / CD45 / SSC

1. verhoogd % CD34⁺ myeloide voorlopercellen
2. verlaagd % CD34⁺ B cellen binnen de totale CD34⁺ fractie
3. afwijkende CD45 expressie van myeloide voorlopercellen vs. lymfocyten
4. verlaagde SSC ratio van granulocyten vs. lymfocyten



Multicentrum studie naar de diagnose van MDS m.b.v. flowcytometrie

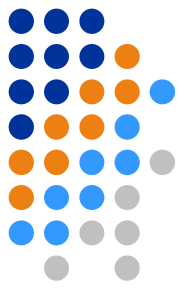


Learning cohort

	FCS					positive cases	sensitivity (%)	specificity (%)
	0	1	2	3	4			
Low-risk MDS	33	50	107	67	24	198/281	70%	
Controls	131	107	16	2	0	18/257		93%

Validation cohort

	FCS					positive cases	sensitivity (%)	specificity (%)
	0	1	2	3	4			
Low-risk MDS	16	26	57	32	5	94/136	69%	
Controls	45	68	7	3	0	10/123		92%



Belang van flowcytometrie in MDS

- ondersteunend of aanvullend op de diagnose
- prognose en voorspellen van succes van behandeling
 - o.a. CD7 expressie op voorlopercellen geassocieerd met
 - transfusieafhankelijkheid en progressieve ziekte
 - geen/korte respons op Epo/G-CSF
- vervolgen van behandeling