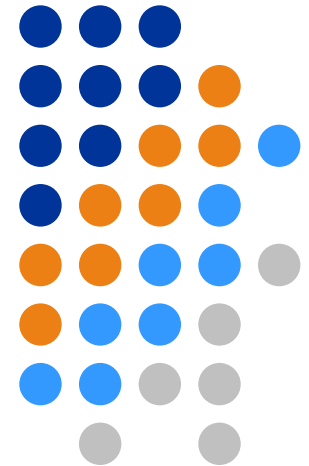


Richtlijnen voor flowcytometrie in MDS

Marisa Westers

Afdeling Hematologie, VU Medisch Centrum, Amsterdam



Implementatie van MDS-FCM in NL

(NVC MDS-flow-werkgroep)



- Discussie over te voeren strategie
 - vanuit literatuur en eigen ervaring
 - Procedure
 - Data-analyse
- Discussie n.a.v. rondzending van
 - List mode data files
 - Vers beenmerg
- Discussie omtrent data analyse en interpretatie
 - Vaste combinaties van antistoffen
 - Minimum aantal cellen per populatie voor analyse
 - Gating strategie
 - Definitie van subpopulatie en denominator
 - Definitie van cut-offs

Richtlijnen vanuit de MDS-werkgroep



- Experimenteel
 - Procedure
 - Antistolling
 - Lysismethode
 - Kleuring
 - Fixatief
 - Antistoffencombinaties
 - Fluorochromen
 - Clonen
 - Fluorescentiepatronen
 - Instrument Setup
 - Scatter
 - Fluorescentie

Richtlijnen voor het antistofpanel

MDS werkgroep en ELNet



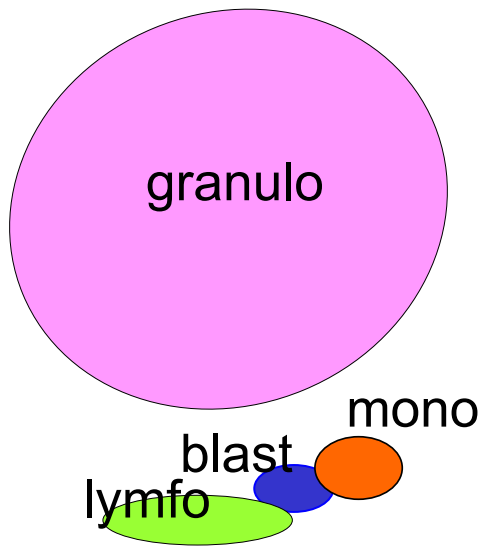
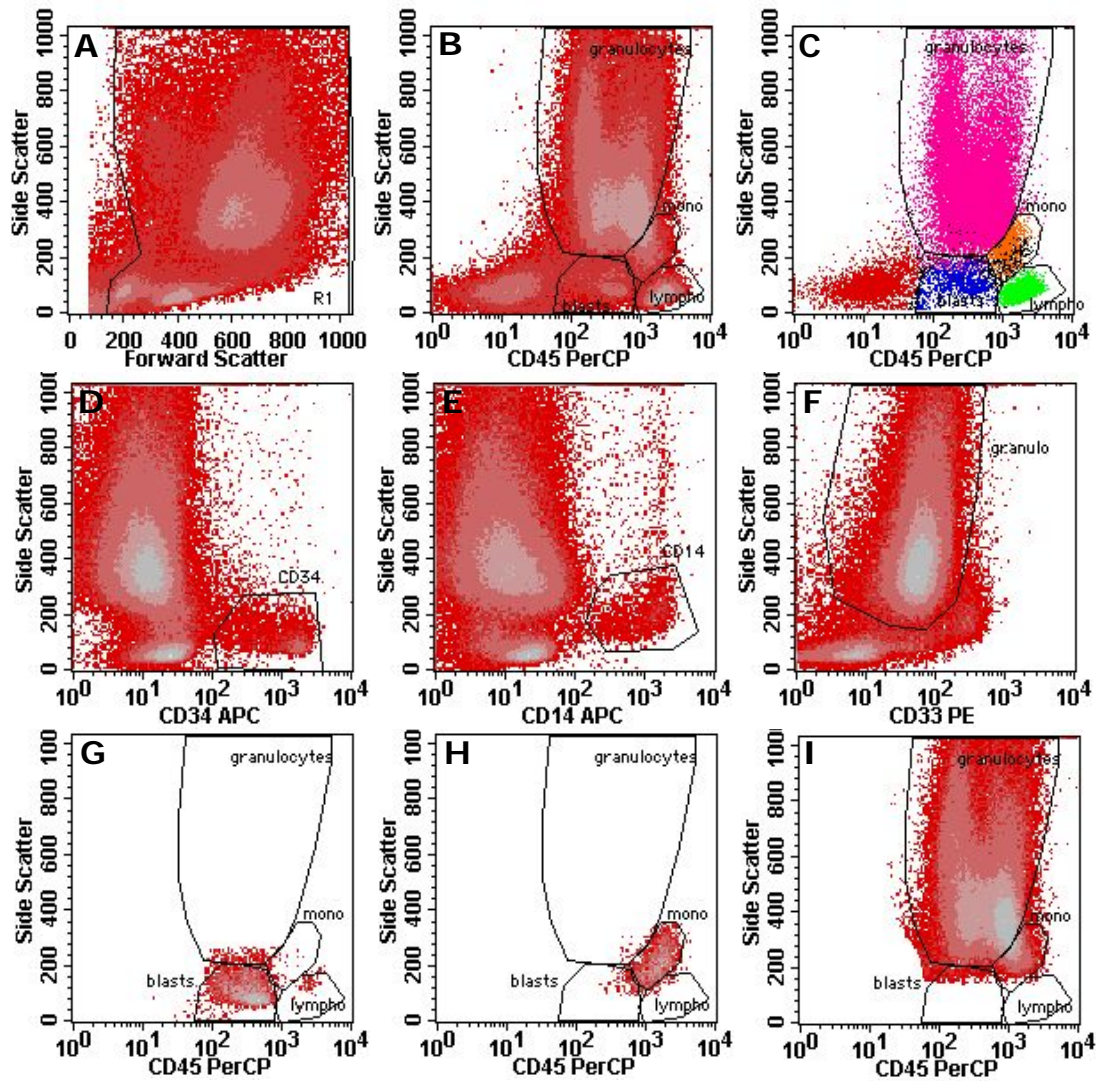
- CD45 als constante merker
- Antistofcombinaties belangrijker dan identieke fluorochromen
 - Blasten
 - CD34-CD117-CD13/33, HLA-DR-CD11b, CD13-CD7
 - CD34 i.c.m. CD11b, HLA-DR, CD5, CD7, CD19, CD56, CD10, CD15
 - Granulocyten
 - CD13-CD16-CD11b, CD33, CD34-CD15, CD10
 - Monocyten
 - CD14-CD33, HLA-DR-CD11b, CD36-CD14, CD64, CD56
 - Erytroid
 - CD71-CD235a of CD71-CD105, CD117

Richtlijnen vanuit de MDS-werkgroep



- Data interpretatie
 - Gating strategie
 - Normaal vs. Aberrant
 - Percentages positief
 - in het algemeen 20%
 - bij blastenaberrantie CD7 10% (interpretatie i.c.m. CD13)
 - Fluorescentiepatronen en relaties tussen antigenen
 - vergelijking met controles
 - 0,5log
 - 1log bij CD56 expressie op monocytten

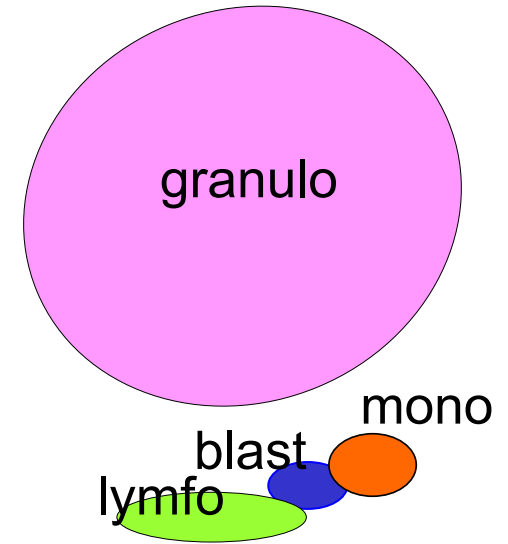
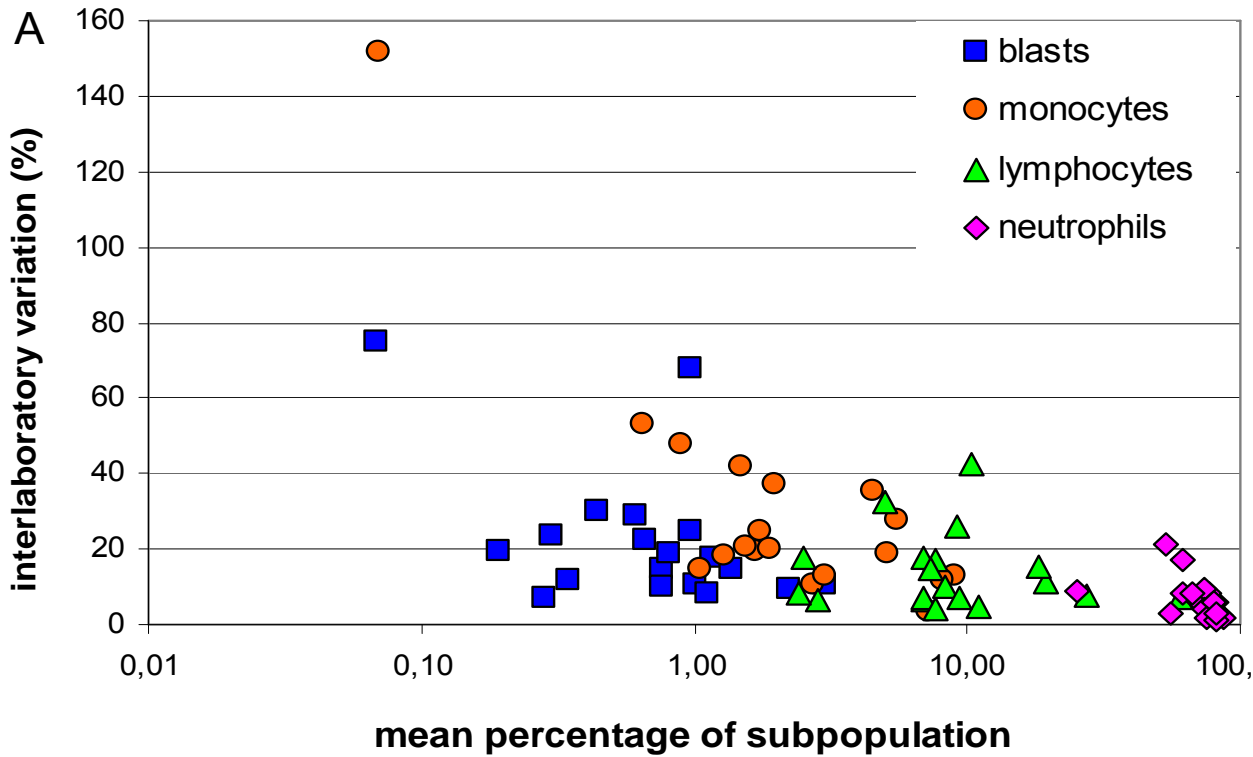
Gating strategie en kleurcode



Interlab-variatie in de FCM diff



Analyse van de diff (list mode data files)



Aanpassing van definities van subpopulaties

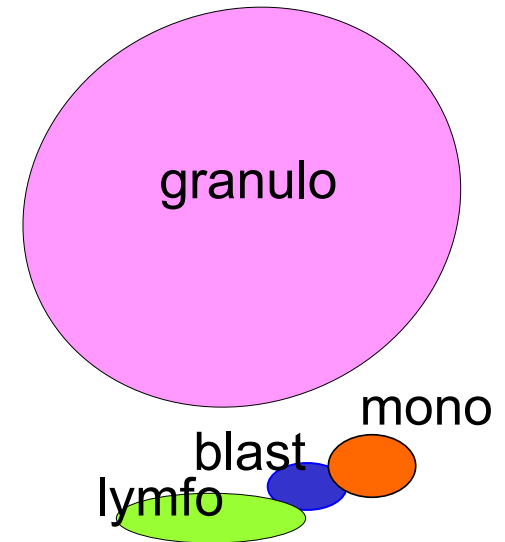
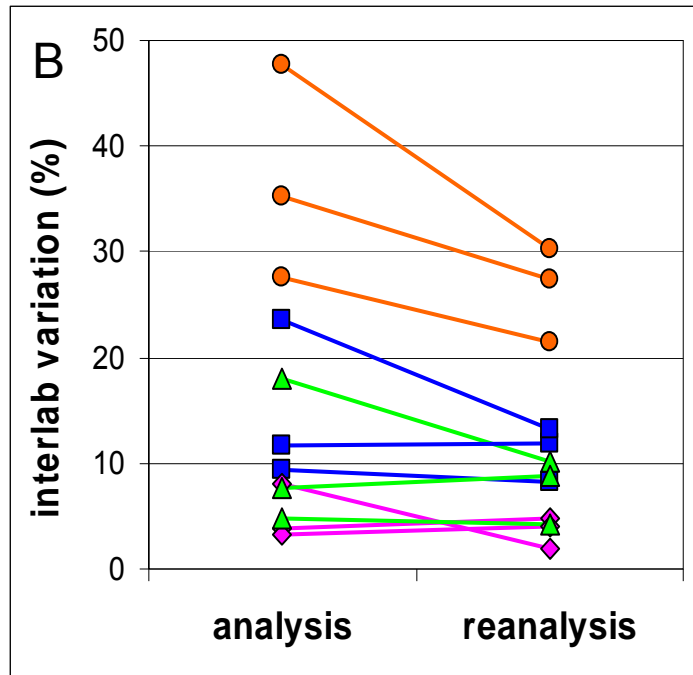


- Lymfocyten
 - CD45++/SSC
- Blasten ... myeloïde voorlopercellen
 - CD45dim/SSC
 - CD34+CD117+
 - HLA-DR+CD11b-
- Granulocyten
 - CD33 i.p.v. CD15 (IgM)
- Monocyten
 - CD33/SSC, CD14/SSC, CD64/SSC
 - Valkuil:
 - Apoptose: lagere FSC
 - CD14 verlies door PNH

De leercurve ...



Blinde heranalyse van LMD files:
verhoogde reproduceerbaarheid tussen de instituten



Optimalisatie van patroonherkenning

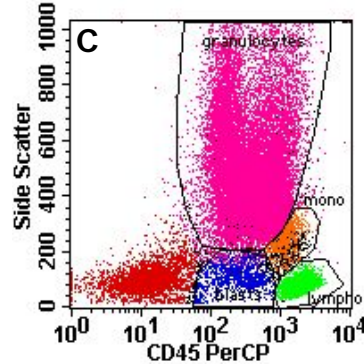


- Definitie van gating strategie en kleurcode
- Vaste weergave van dotplot (X- en Y-as)
- Vast aantal *events* voor interpretatie van patronen
 - 20.000 voor granulocyten
 - 2.000 voor monocyt (minimaal 250)
- Definitie van minimaal aantal *events* in populatie voor betrouwbare analyse van aberranties (gevoeligheid)
 - minimaal 250 voor voorlopercellen
 - minimaal 250 voor monocyt

Optimalisatie van patroonherkenning

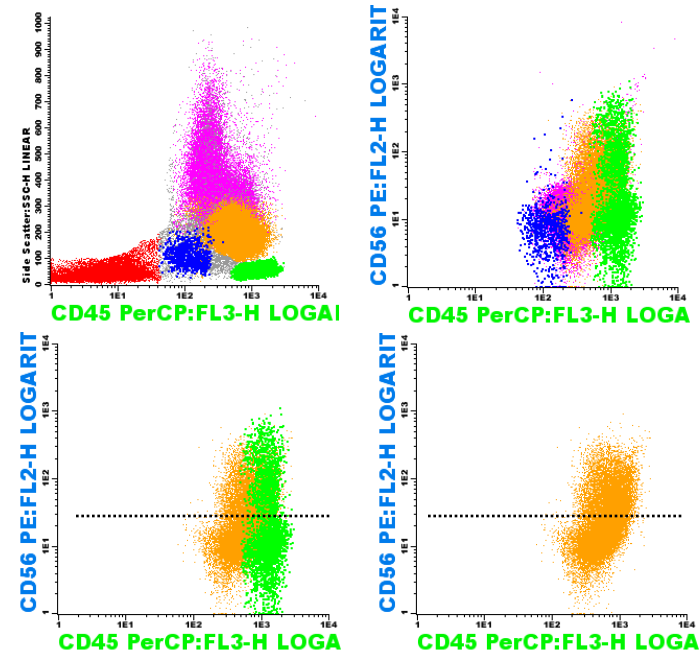


Kleurcode vergemakkelijkt interpretatie,
bijv. aberrante CD56 expressie op monocytten



richtlijn:

- groen voor lymfocyten
- oranje voor monocytten
- blauw voor immature cellen
- roze voor granulocyten



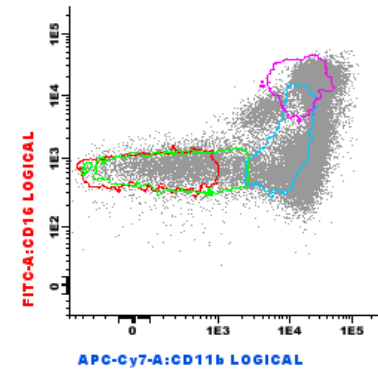
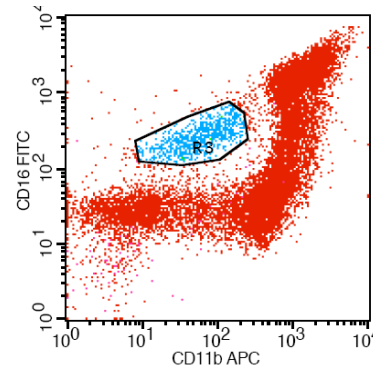
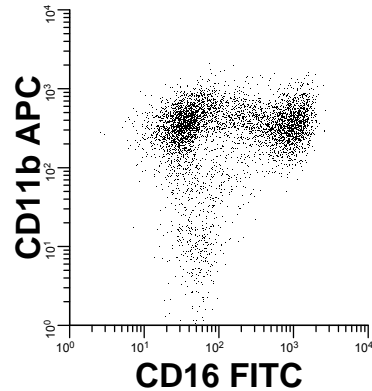
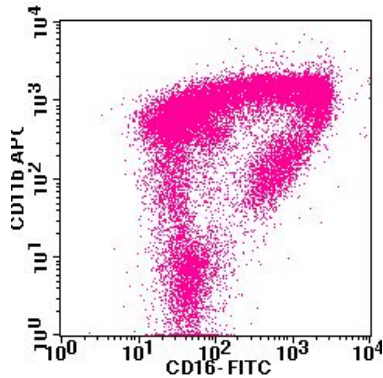
toepassing in data analyse

Optimalisatie van patroonherkenning

synchronisatie van X- en Y-assen



Beenmerg verwerkt en geanalyseerd door meerdere centra

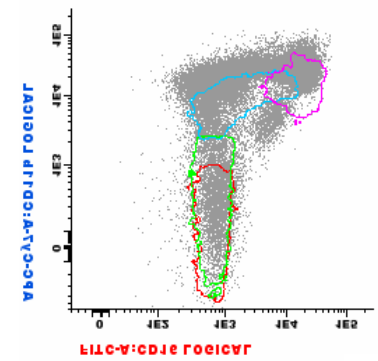
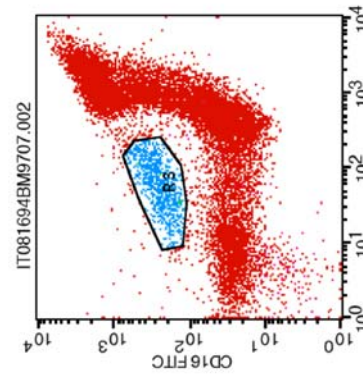
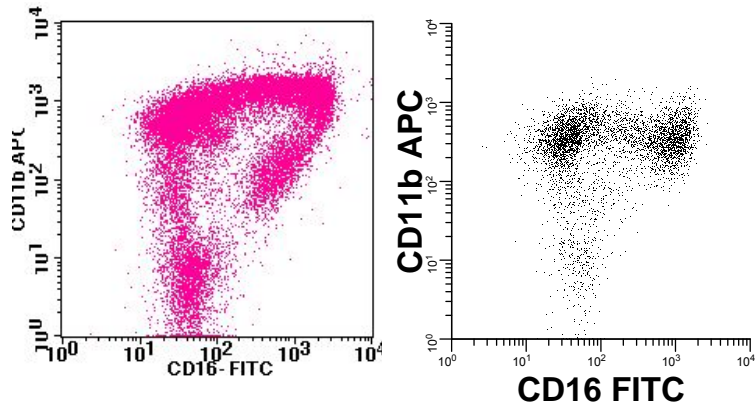
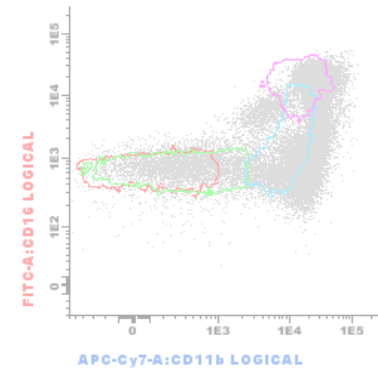
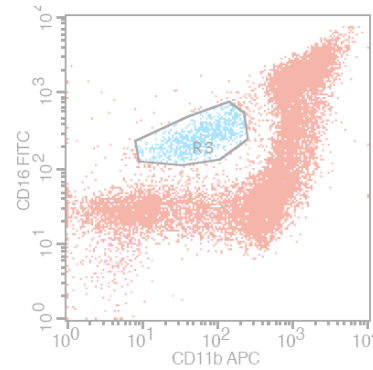
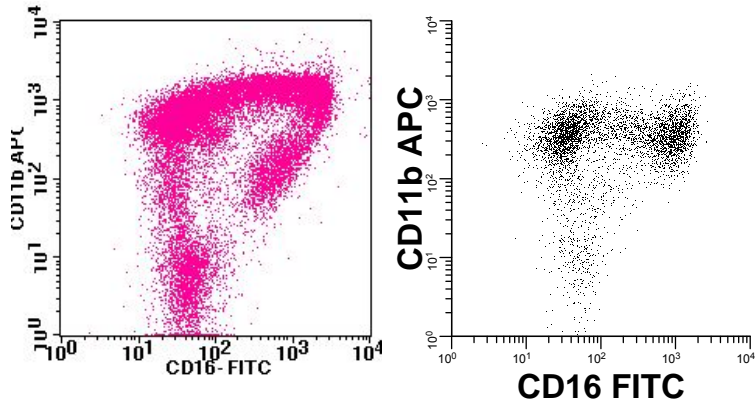


Optimalisatie van patroonherkenning

synchronisatie van X- en Y-assen



Identieke weergave van X- en Y-assen voor snelle patroonvergelijking tussen centra (en patiënt-controle)

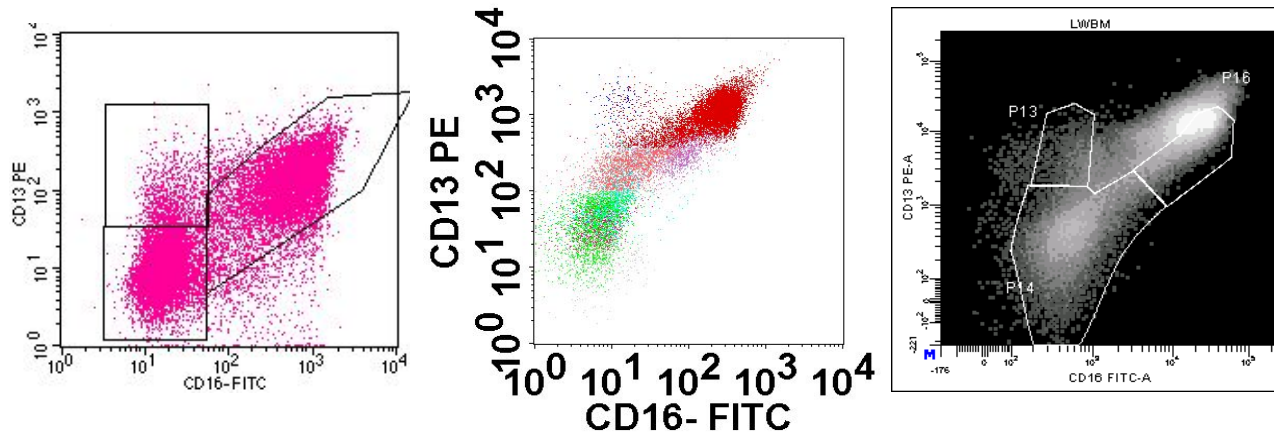


Optimalisatie van patroonherkenning

synchronisatie van weergave en aantal events



Beenmerg verwerkt en geanalyseerd door meerdere centra,
CD16 vs. CD13



aberrant?

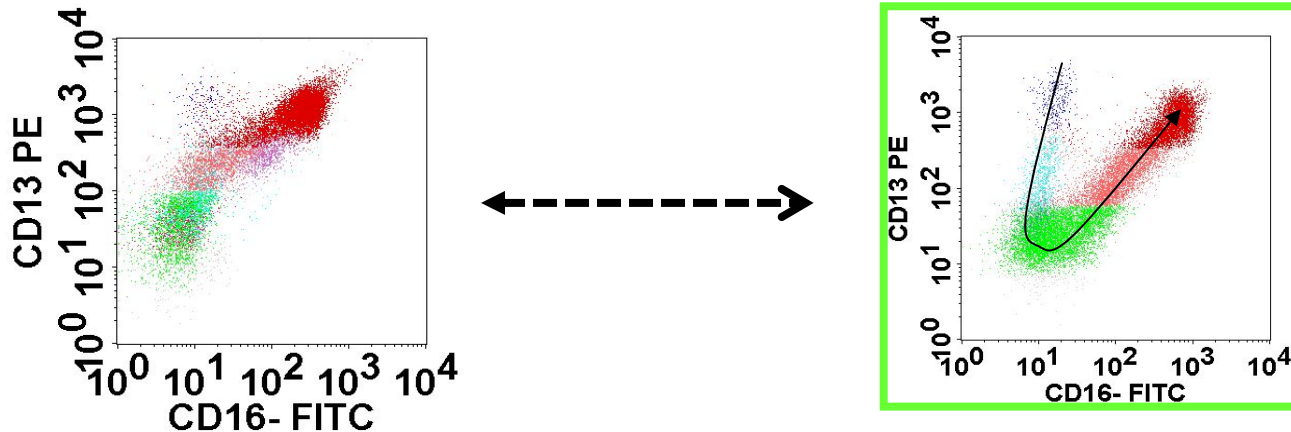
Optimalisatie van patroonherkenning

synchronisatie van aantal events



Vergelijkbare aantallen events vergemakkelijkt vergelijking van maturatiepatronen:

- tussen centra
- tussen patiënt en controle binnen een centrum



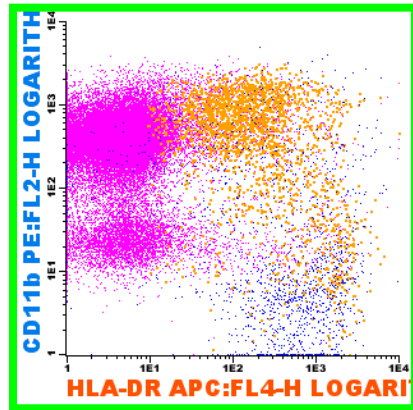
Optimalisatie van patroonherkenning

synchronisatie van aantal events

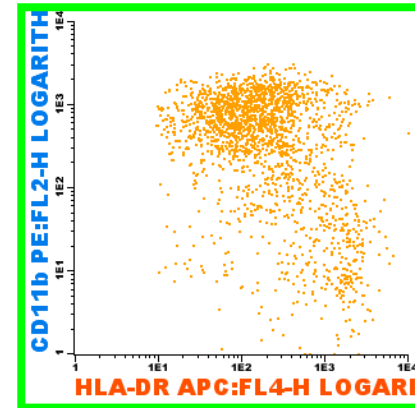


HLA-DR vs. CD11b
monocyten

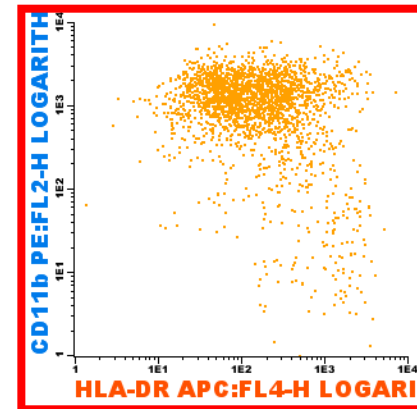
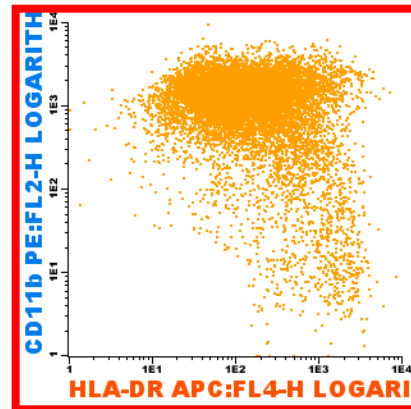
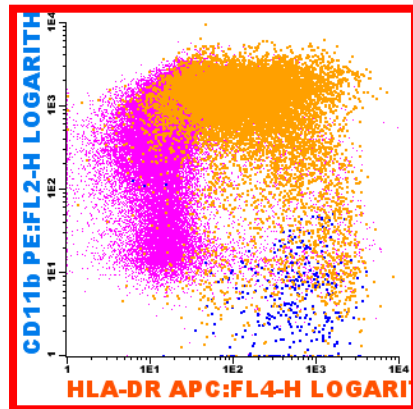
4442



2000 mono-events

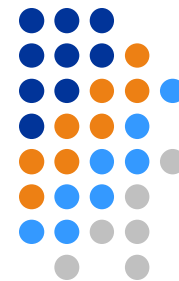


4406

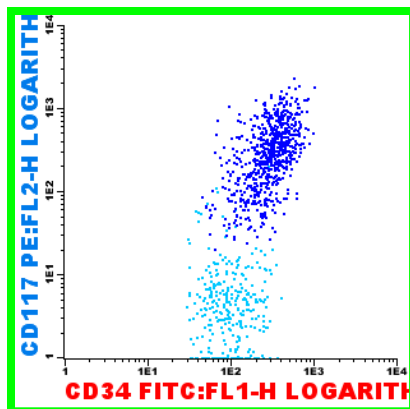


Optimalisatie van patroonherkenning

standaardisatie van interpretatie

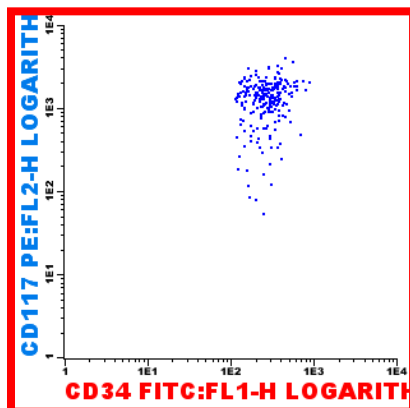
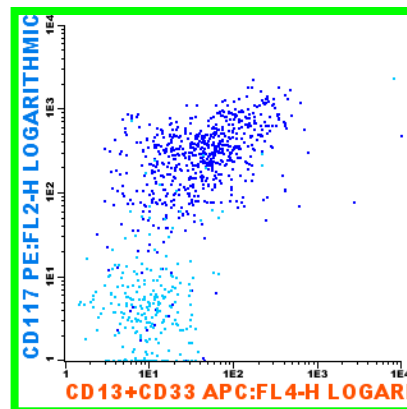


CD34-CD117

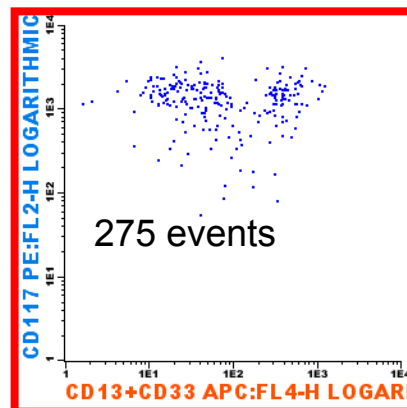


4442

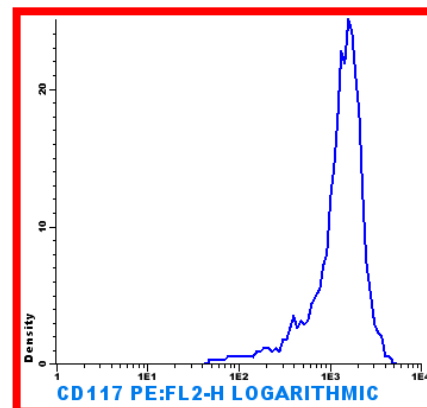
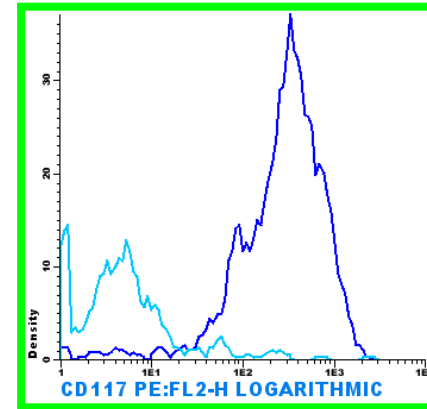
CD13/33-CD117



4406



CD117



Myeloïde voorlopercellen

CD117 overexpressie (ca. 1log)
homogeen (lage CV)

Valkuilen



- Experimenteel
 - Procedure
 - Antistolling, bijv. EDTA
 - lysis en fixatie methode
 - kleuring: lyse-stain-wash vs. stain-lyse-wash
 - Antistoffen
 - keuze van fluorochromen, clonen en isotype
 - Instrument Setup
 - calibratie, compensatie en stabiliteit
- Data interpretatie
 - contaminatie van voorloperpopulatie met baso, pDC, plasmacellen , ...
 - overlap van subpopulaties, o.a. door hypogranulaire granulocyten
 - eo's in granulo-patroon
 - aspecificiteit en adherentie van lymfocyten
 - effect van activatie of apoptose aanzien voor aberrantie

Toekomst



- Experimenteel
 - Procedure
 - Lysis en fixatie
 - >4-kleuren flowcytometrie
Voorlopig nog geen standaardisatie van fluorochromen en clonen
 - Instrument Setup
 - Standaardiseren?

Toekomst



- Validatie en implementatie van flow-score systeem
 - Diagnose (NL en ELNet)
 - Wat is minimaal nodig?
 - Prognose (Europese werkgroep ELNet)
 - Wat is minimaal nodig?
- Validatie en implementatie analyse van erythroïde reeks (NL en Elnet)

Toekomst



- Validatie en implementatie van erythroïde reeks (NL en Elnet)
- ELNet-MDS flow 2011:
variabelen met significant onderscheid controle vs. MDS:
 - %kernhoudend rood
 - patroon CD235a vs. CD71
 - Verlaagde CD71 expressie
 - Verhoogd aantal CD117+ voorlopers

maar...

- CD45neg *gate* sluit veel voorlopers uit....
heranalyse noodzakelijk in CD45dim-tot-neg *gate*

Toekomst



- Data interpretatie
 - Nieuwe software, nieuwe mogelijkheden
 - Subpopulaties meer in onderlinge relatie bekeken i.p.v. apart

