

Casuïstiek en valkuilen van flowcytometrie in MDS



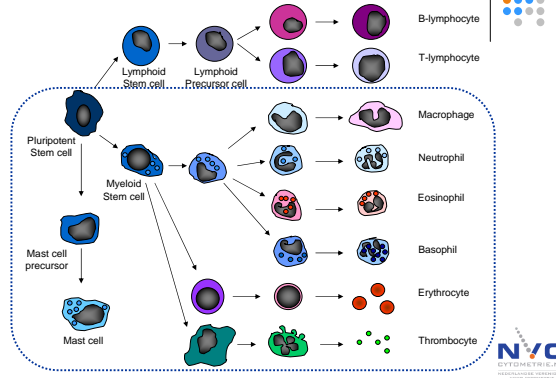
Interpretatie van data

Vincent van der Velden

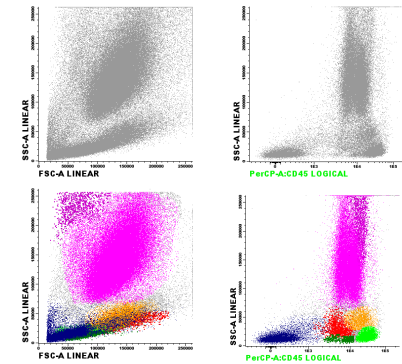
Afdeling Immunologie, Erasmus MC, Rotterdam



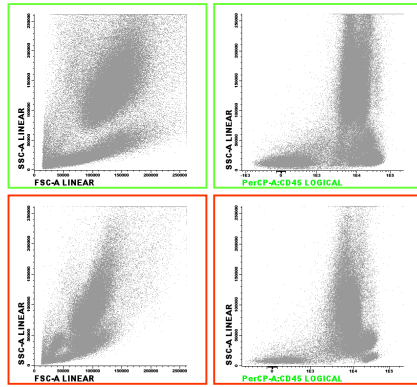
Samenstelling van het materiaal



Populaties in normaal beemerg



Populaties in beenmerg van MDS patiënten

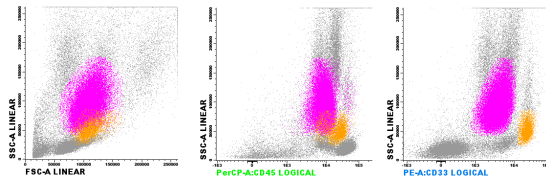


normaal

MDS



Hypogranulariteit van granulocyten



→ Aanvullende markers belangrijk voor goede gating
→ Let op: immunofenotype in MDS kan afwijkend zijn



Definities van (sub)populaties

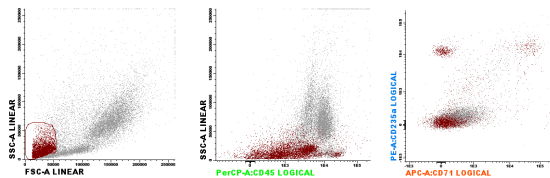
Sub population Definition	
Nucleated red cells	CD45 ^{CD235a} CD71 ^{SSC^{low}}
Myeloblasts	CD45 ^{dim} SSC ^{low} CD34 ^{CD117} in combination with a myeloid marker (CD13, CD33) or CD45 ^{dim} SSC ^{low} CD117 ^{HLA-DR} CD11b (2008)
Maturing neutrophils	CD33 ^{dim} back gated in CD45/SSC plot
Monocytes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

Uitgedrukt als percentage van leukocyten + kernhoudend rood



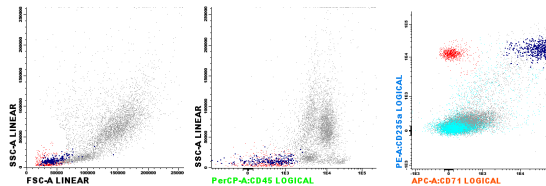
Exclusie van debris/niet-kerhoudend rood

Percentages van leukocyten inclusief kernhoudend rood → exclusie debris en niet-gelyseerd rood



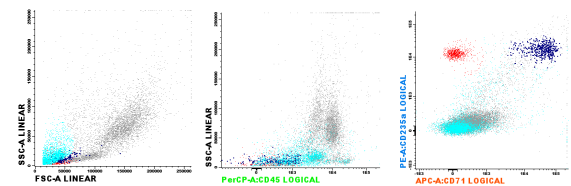
Exclusie van debris/niet-kerhoudend rood

Debris/rood: niet altijd eenvoudig te excluseren!



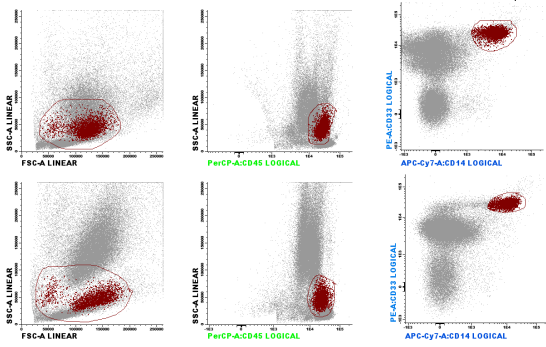
Exclusie van debris/niet-kerhoudend rood

Debris/rood: niet altijd eenvoudig te excluseren!



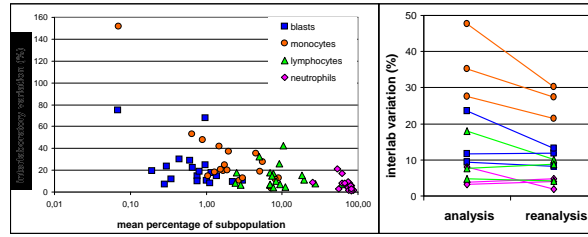
Definitie van monocyten

Apoptotische monocyten



Interlaboratorium variatie in de FCM diff

Analyse van de FCM diff (list mode data files)



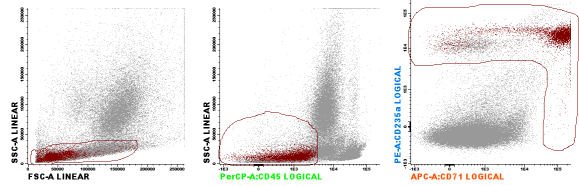
→ Standaardisatie essentieel voor verkrijgen vergelijkbare data!

Interpretatie van de populaties/patronen

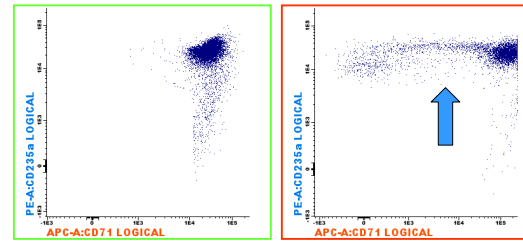
Afwijkingen in:

- Erytroide uitrijping
- Myeloide uitrijping
- Monocyttaire uitrijping
- Myeloide blasten

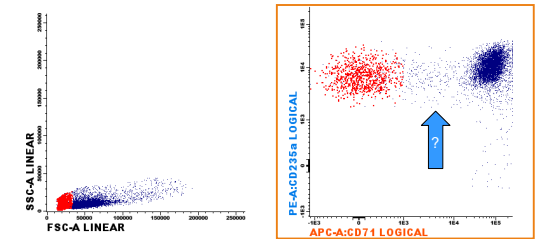
Erytroide uitrijping – gating



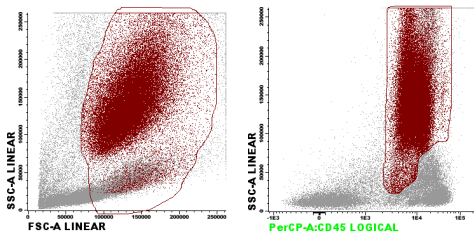
Erytroide uitrijping – aberranties



Erytroide uitrijping – aberranties

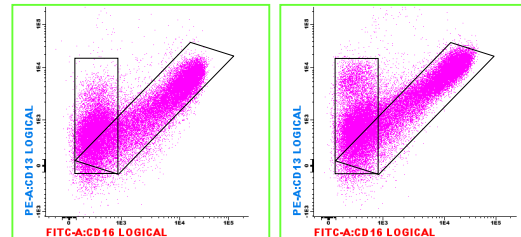


Myeloide uitrijping - gating

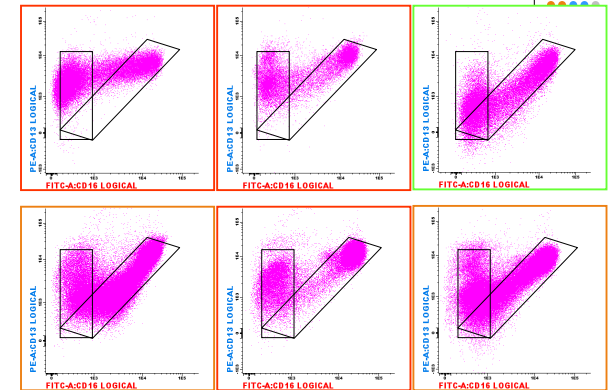


N.B. Complexer in MDS patienten!

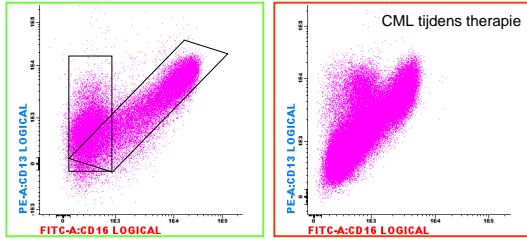
Myeloide uitrijping – normaal



Myeloide uitrijping – aberranties (1)



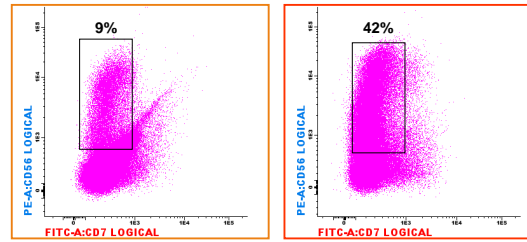
Myeloïde uitrijping – aberranties (2)



→ Afwijkingen kunnen ook in niet-MDS patienten worden gezien!



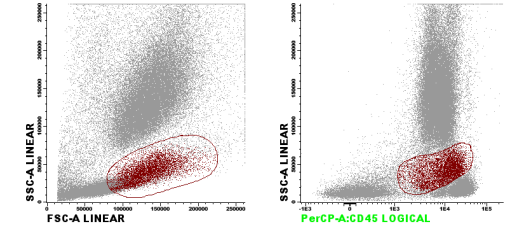
Myeloïde uitrijping – aberranties (3)



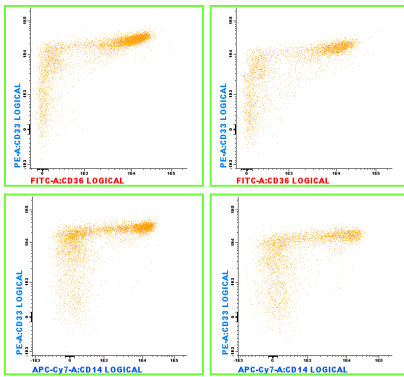
→ Afwijkend indien >10% van de cellen afwijkend



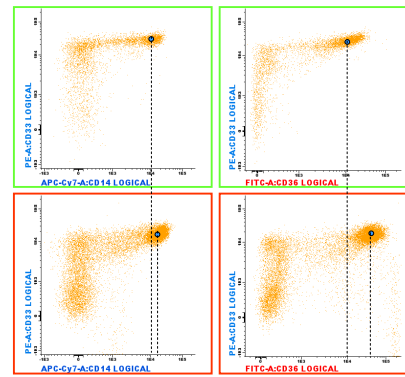
Monocytair uitrijping – gating



Monocytair uitrijping – normaal



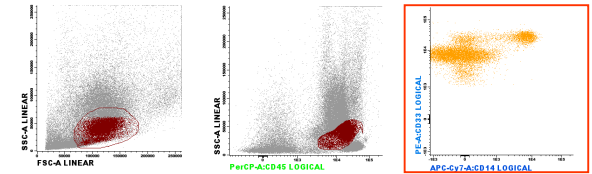
Monocytair uitrijping – aberranties



Aberant:
≥0.5 log verschil



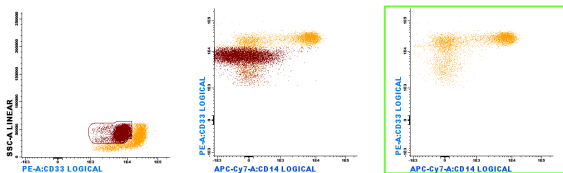
Monocytair uitrijping – aberranties (2)



→ Monocytair uitrijping verstoord ?



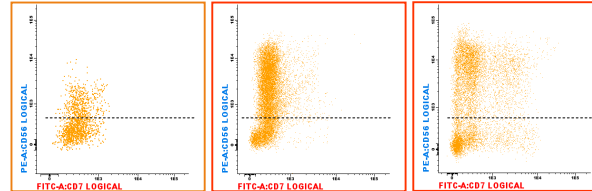
Monocytair uitrijping – aberranties (3)



→ Contaminatie van monocyten gate met hypogranulaire neutrofielen
→ Monocytair uitrijping verstoord



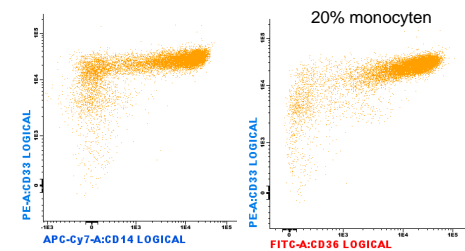
Monocytair ontwikkeling – aberranties (4)



→ CD56 expressie op monocyten: >1 log afwijkend van normaal
→ lage CD56 expressie ook op geactiveerde/gestreste monocyten



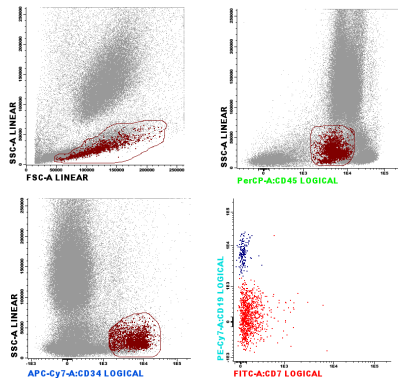
Monocytair uitrijping – percentages



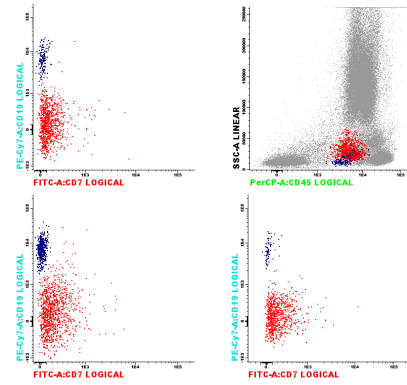
CMML patient



Myeloïde blasten – gating

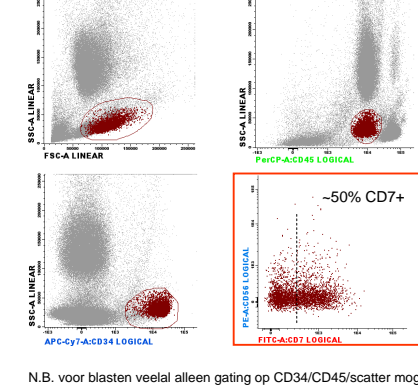


Myeloïde blasten - normaal



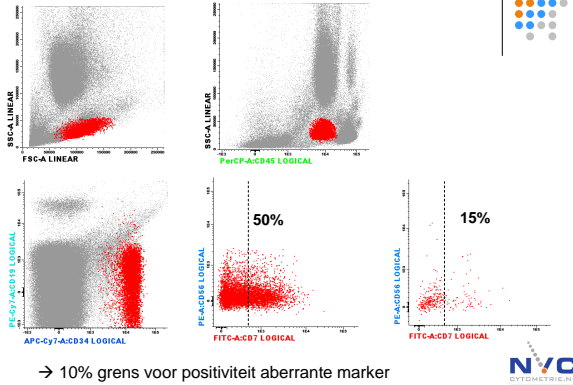
Voorloper-B-cellen:
- Leeftijdsafhankelijk
- Vaak ↓ bij MDS

Myeloïde blasten – aberranties (1)



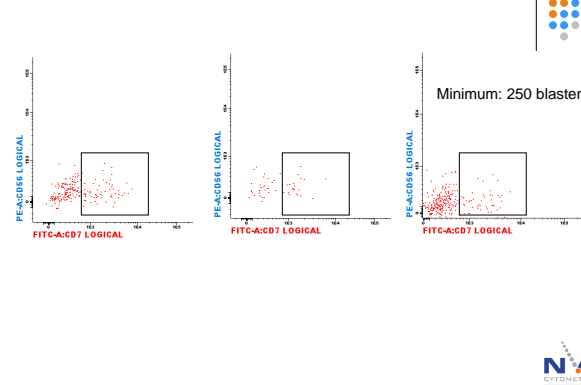
N.B. voor blasten veelal alleen gating op CD34/CD45/scatter mogelijk

Myeloïde blasten – aberranties (2)



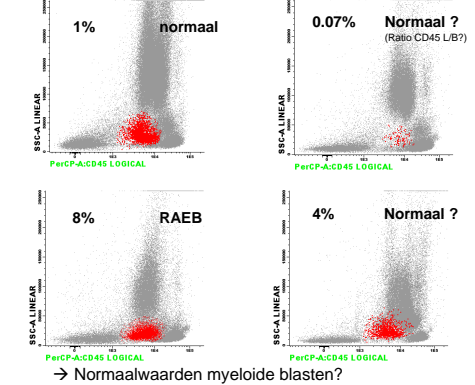
→ 10% grens voor positiviteit aberrante marker

Myeloïde blasten – aberranties (3)



Minimum: 250 blasten

Myeloïde blasten – percentages



→ Normalwaarden myeloïde blasten?

Conclusies

- Voor juiste interpretatie zijn goede controle groepen essentieel

Table 6. Proposed list of pathological controls to determine the specificity of flow cytometric aberrancies in myelodysplastic syndromes.

AML, hypoplastisch; AML, CML,

Chronic myeloproliferative disease (e.g. PV, ET),

Aplastic anemia, PNH,

Myelofibrosis (p/s MPD and/or MDS), systemic mastocytosis, chronic eosinophilic leukemia

Langerhans cell histiocytosis (LCH), hemaphagocytosis, anemia of

Chronic diseases, anemia in autoimmune diseases (ATP: Rheumatoid Arthritis, SLE, SS), anemia due to renal insufficiency

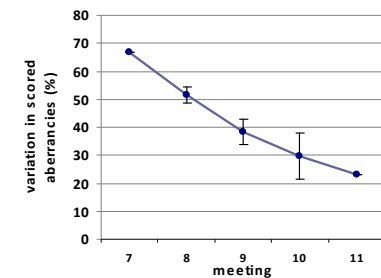
Secondary MDS, post-chemotherapy, drugs interfering with angio-genesis,

Post-stem cell transplant settings (autologous or allogeneic stem cell Tx)

Conclusies

- Voor juiste interpretatie zijn goede controle groepen essentieel
- Interpretatie van afwijkingen is nu nog erg subjectief (binnenkort: Infinicyt)
- Een flow score is nodig om de verschillende afwijkingen te scoren en uiteindelijk een conclusie te kunnen trekken
 - Nog geen (inter)nationale standaard aanwezig
- Standaardisatie belangrijk voor implementatie in diagnostiek
 - Werkgroep NVC MDS
 - European LeukemiaNet

“The learning curve ...”



→ Aanzienlijke verbetering na goede afspraken, vele discussies en toename van ervaring