

Workshop Master Class: flowcytometrie in MDS

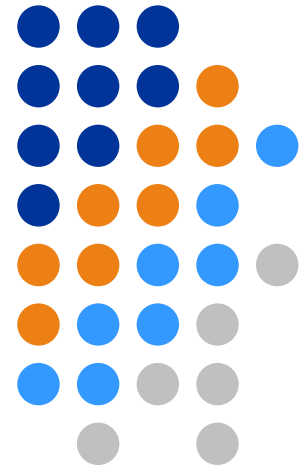


Werkgroep: Progenitoren

Rik Brooimans, Andre Bijkerk, *Laboratorium Medische en Tumorimmunologie, Erasmus MC – Daniel den Hoed, Rotterdam*

André Mulder, *Afdeling Laboratoriumgeneeskunde, UMCG, Groningen*

Claudia Cali, *Afdeling Hematologie, VU Medisch Centrum, Amsterdam*



Workshop doelstelling en outline: Progenitoren



- Doelstelling: het vaststellen van laboratorium richtlijnen, waarin de rol van flowcytometrie in de diagnose en prognose van MDS is gedefinieerd

Outline workshop:

- Minimale benodigdheden om dysplasie mbv flowcytometrie vast te stellen
- Normaal vs afwijkend
- Definities en gating strategie (André Bijkerk)
- Voorbeelden van aberranties

Introductie: Immuunfenotypering MDS

- MDS: heterogene groep van myeloïde neoplasieën
- Geen unieke of specifieke markers
- Voorspellende waarde op basis van aantal aberranties
- Hoe meer afwijkingen aangetoond des te meer ondersteuning voor de diagnose MDS



Progenitoren: myeloïde blasten



- Analyse van de myeloïde voorlopercellen
 - Percentage myeloïde blasten
 - FSC/SSC karakteristieken
 - CD117 expressie
 - Expressie van maturatie merkers
 - Expressie van lineage infidelity merkers

Minimale vereisten voor FCM analyse



- Internationaal consortium en ELN werkgroep heeft een lijst opgesteld met benodigde merkers waarmee het mogelijk is om abnormale expressie van merkers en relatie tussen merkers binnen de diverse lineages inzichtelijk te maken
 - CD45 als backbone
 - Geen restricties betreffende fluorochroom keuze en antistof klonen
 - 4- of meerkleuren

Benodigde markers



General core markers

CD45

—

—

CD34

CD117

HLA-DR

CD11b

CD13

CD16

CD33

CD14

—

—

CD7

CD56

CD19

—

—

—

—

Erythroid

CD45

CD71

CD235a

—

CD117

—

—

—

—

—

—

CD36

—

—

—

—

—

—

—

—

Progenitors

CD45

—

—

CD34

CD117

HLA-DR

CD11b

CD13

—

—

—

—

—

CD7

CD56

CD19

CD5

—

CD15

—

Maturing neutrophils

CD45

—

—

CD34

CD117

HLA-DR

CD11b

CD13

CD16

CD33

CD14

—

CD64

—

CD56

—

—

—

CD15

CD10

Monocytes

CD45

—

—

CD34

CD117

HLA-DR

CD11b

CD13

CD16

CD33

CD14

CD36

CD64

—

CD56

—

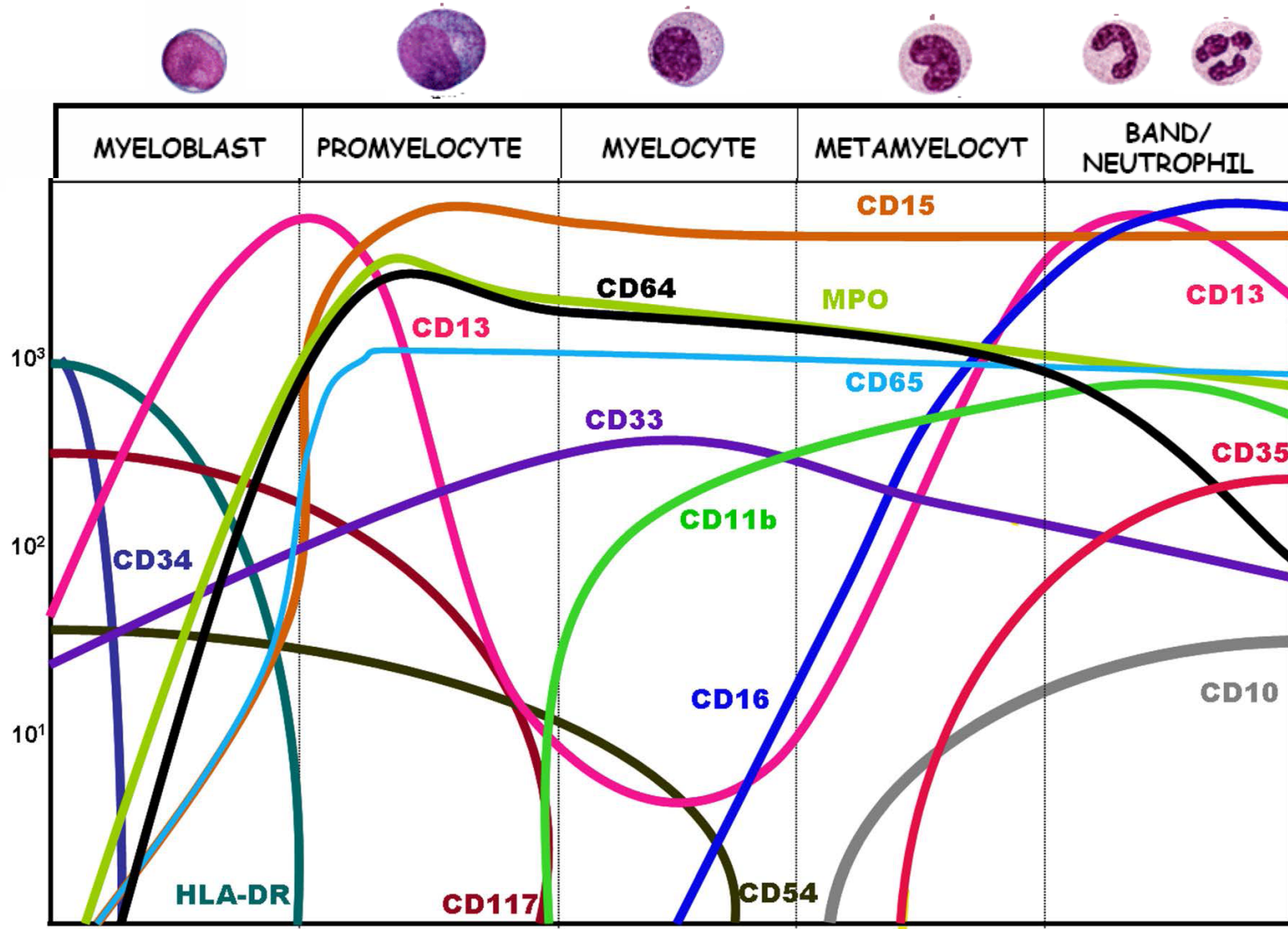
—

CD2

—

—

Myeloïde differentiatie



Minimale flow parameters: onrijp compartiment



<i>Bone marrow subset</i>	<i>Recommended analyses</i>	<i>Aberrancy</i>
Immature myeloid and monocytic progenitors	Percentage of cells in nucleated cell fraction	Increased percentage
	Expression of CD45	Lack of/decreased/increased expression
	Expression of CD34	Lack of/decreased/increased expression
	Expression of CD117	Homogenous under/overexpression
	Expression of HLA-DR	Lack of/increased expression expression
	Expression of CD13 and CD33	Lack of/decreased/increased
	Asynchronous expression of CD11b, CD15	Presence of mature markers
	Expression of CD5, CD7, CD19, CD56	Presence of lineage infidelity markers
Progenitor B cells	Enumeration as fraction of total CD34+ based on CD45/CD34/SSC in combination with CD10 or CD19	Percentage decreased or absent



Gating strategie (*MDS-werkgroep*)

Myelo = beenmerg

Dys = abnormaal

Plasie = vorming

Syndroom = complex van symptomen

- Om te kunnen bepalen of (beenmerg)cellen abnormaal uitrijpen of een complex van symptomen laat zien, is het noodzakelijk om eerst de normale profielen van de verschillende leukocytenpopulaties in kaart te brengen en vast te leggen (normaalwaarden* van gezonde donoren).

(*Deze normaalwaarden zijn instituut-afhankelijk)

Immunologische differentiatie



Om de immunologische profielen van de leukocyten populaties “vast” te leggen zijn ‘immunologische definities’ nodig voor de afzonderlijke populaties.

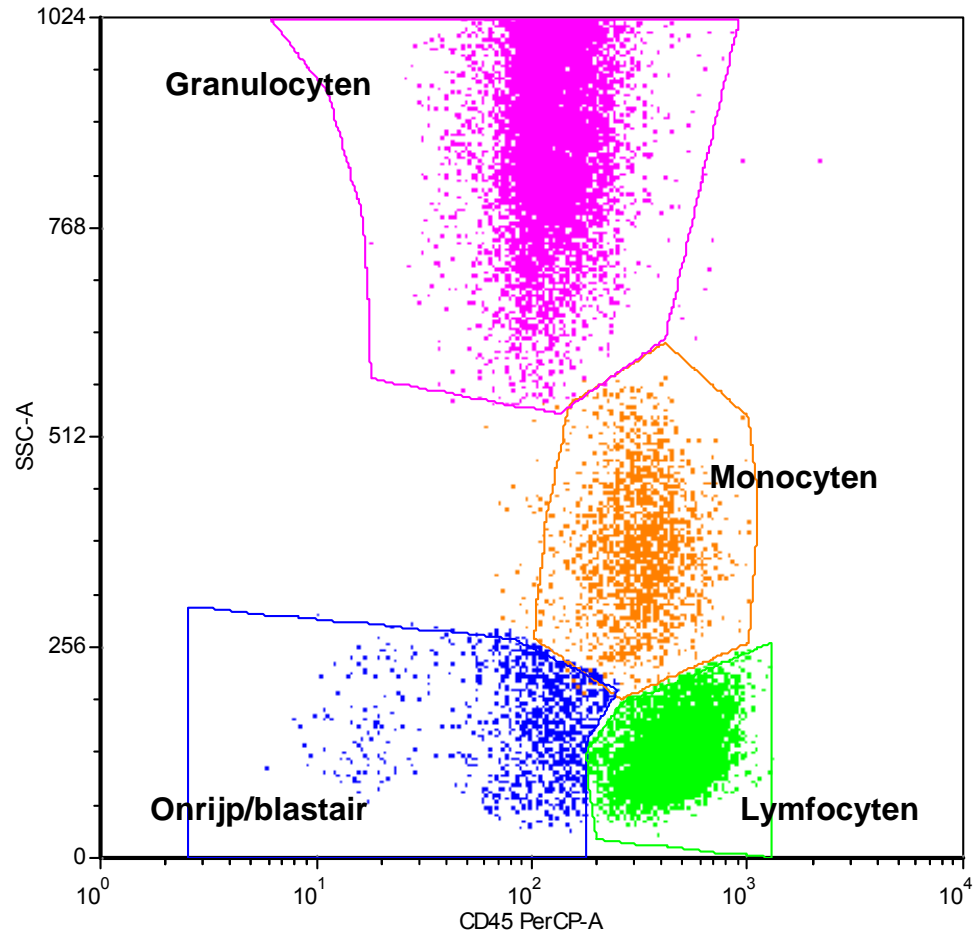
- Lymfocyten** : CD45+, SSC laag.
- Monocyten** : CD64+, CD33+; “back-gated” in CD45/SSC plot en CD14+
- Granulocyten** : CD33(+); “back-gated” in CD45/SSC plot (en CD14-)

- Precursor B cellen**: CD45(+), SSC laag, CD34+, CD19+
- Promyeloocyten** : CD45(+), SSC int/hoog, CD34-, CD117+, (HLA-DR-)*
- Myeloblasten** : CD45(+), SSC laag, CD117+, HLA-DR+, CD11b-
: CD45(+), SSC laag, CD34+, CD117+, CD13/33+

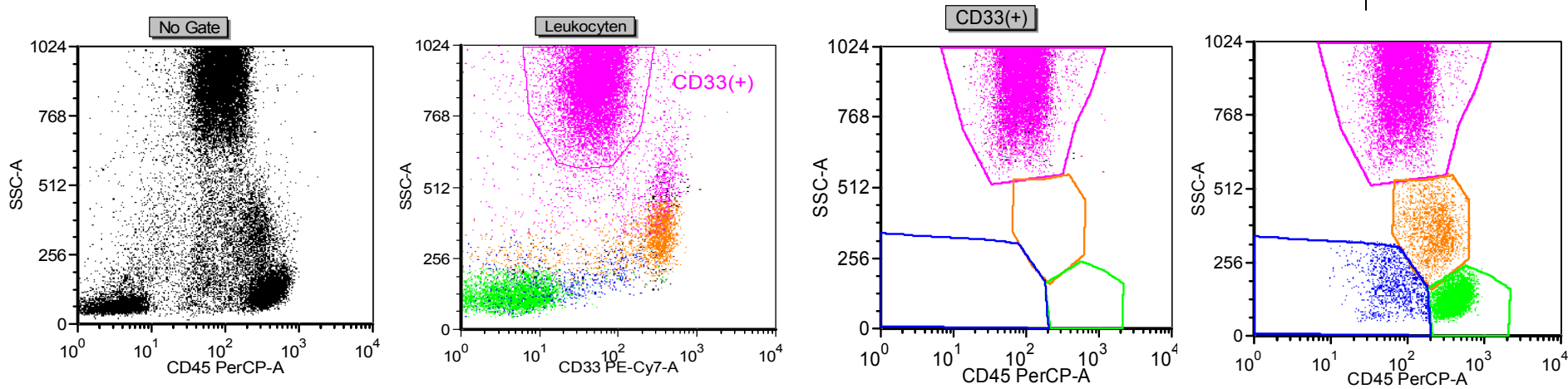
Immunologische differentiatie



CD45 (pan leukocyten merker) versus SSC



Verificatie van subpopulaties dmv back-gating: vb. granulocyten.



Door middel van back-gating wordt het mogelijk om de gates of regio's strikter te plaatsen om zo "vervuiling" van andere populaties tegen te gaan.

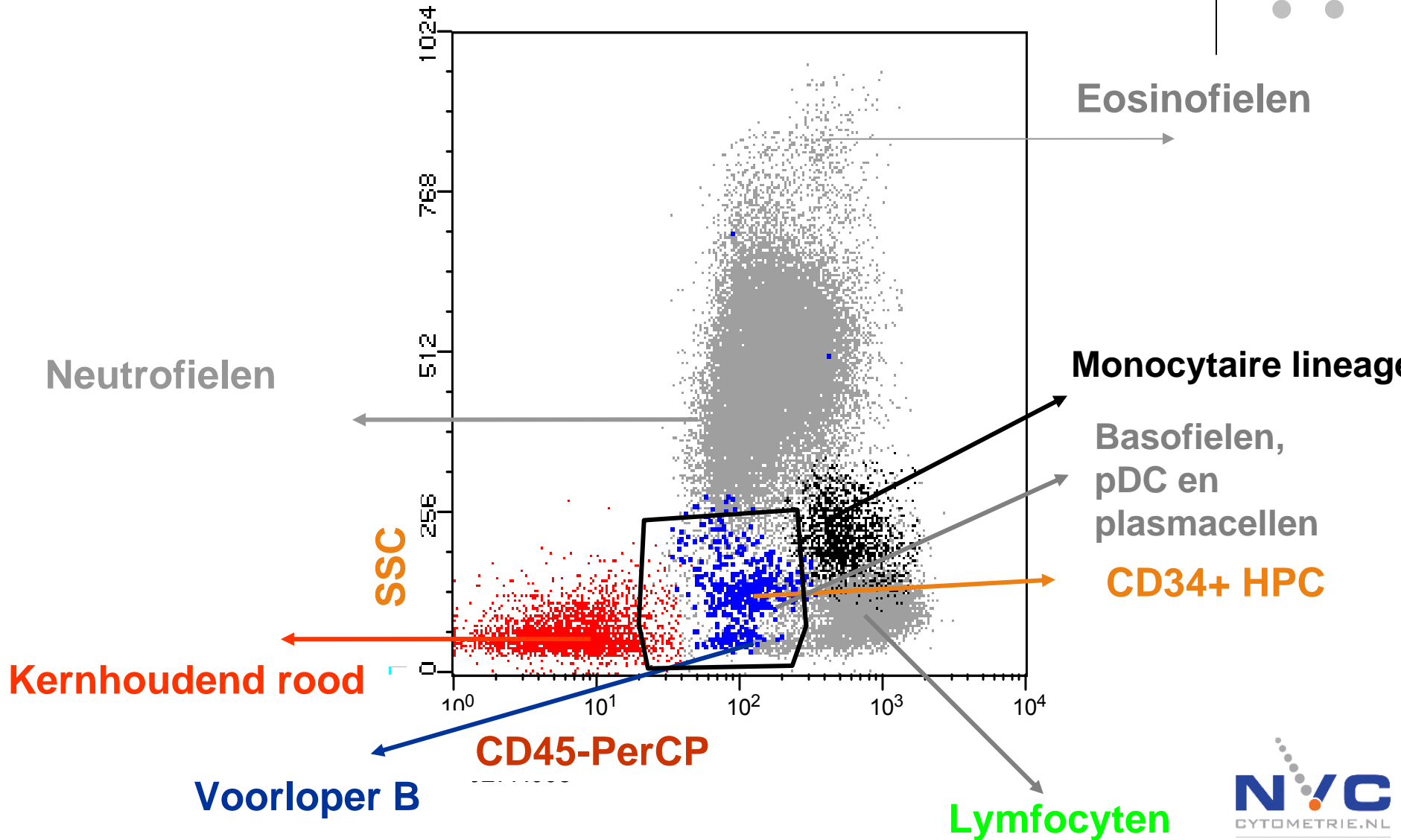
CAVE: andere maligniteiten kunnen ook expressie vermindering of verlies geven (PNH: back-gating van mono's met CD14, is GPI gelinkt).

CD45^{dim}, SSC^{low/int}: onrijp gate

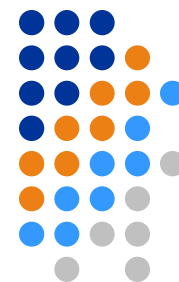


- Heterogene celpopulaties binnen onrijp compartiment:
 - Myeloïde voorloper cellen
 - Voorloper B cellen
 - Monoblasten/promonocyten
 - Basofielen
 - Erythroblasten
 - Plasmacytoïde dendritische voorlopercellen
 - Plasmacellen

NBM: multilineage differentiatie

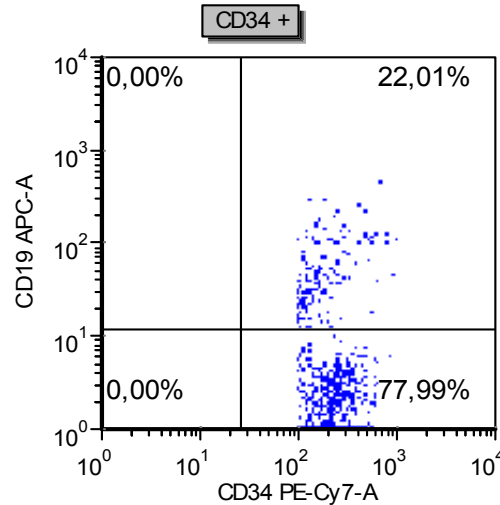
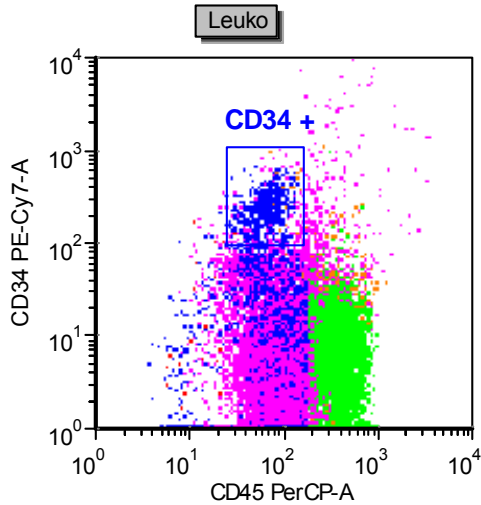


Definities voor identificatie van subpopulaties in BM mbv flowcytometrie



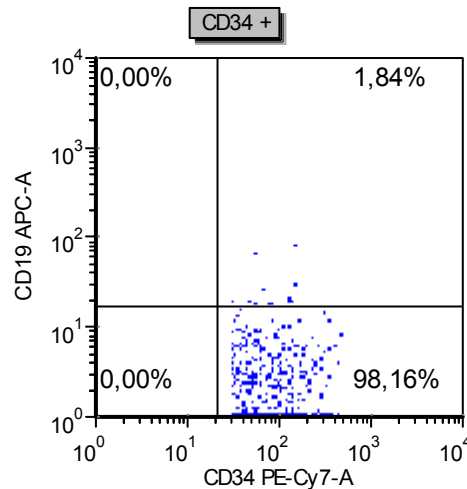
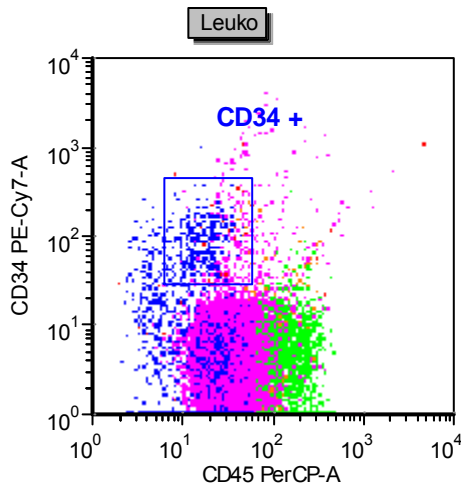
Sub population	Definition 2006	Definition adjustments in 2007, 2008 or 2011
Nucleated red cells	CD45 ⁻ CD235a ⁺ CD71 ⁺	CD45 ⁻ CD235a ⁺ CD71 ⁺ SSC ^{low}
Myeloblasts	CD45 ^{dim} SSC ^{low} CD34 ⁺ , CD117 ⁺ check for CD34 ⁻ blasts: CD45 ^{dim} CD13/33	CD45 ^{dim} SSC ^{low} CD34 ⁺ CD117 ⁺ in combination with a myeloid marker (CD13, CD33) or CD45 ^{dim} SSC ^{low} CD117 ⁺ HLA-DR ⁺ CD11b ⁻ (2008)
Maturing neutrophils	CD15 ⁺ back gated in CD45/SSC plot	CD33 ^{dim} back gated in CD45/SSC plot
Monocytes	CD14 ⁺ back gated in CD45/SSC plot	CD64 ^{bright} and CD33 ^{bright} back gated in CD45/SSC plot; CD14 ⁺ on mature monocytes (2011)
Lymphocytes	CD45 ^{bright} SSC ^{low} CD5 ⁺ or CD19 ⁺	CD45 ^{bright} SSC ^{low}
Precursor B cells	CD45 ^{dim} SSC ^{low} CD34 ⁺ CD19 ⁺	Conform
Plasmacytoid DC	CD123 ⁺ HLA-DR ⁺⁺	CD123 ⁺ HLA-DR ⁺⁺ regardless of CD34 ⁺
Basophils	CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	CD123 ⁺ HLA-DR ⁻ SSC ^{low}
Promyelocytes	-	CD34 ⁻ CD117 ⁺ CD34 ⁻ CD117 ⁺ SSC ^{high} (2008)

Dual anchor gating (CD45/SSC + Lineage-specifieke merkers CD34/CD19)



Normaal beenmerg

CD34+ : 1,4% van de leukocyten
Prec.B : 22% van de CD34+ cellen (>7,2)
CD34+ MBL: 1,1% van de leukocyten (<2,2)



MDS beenmerg

CD34+ : 0,9% van de leukocyten
Prec.B : 2% van de CD34+ cellen
CD34+ MBL: 0,9% van de leukocyten

Hypogranulariteit en onderexpressie van CD45 op myeloblasten als parameter.



Onderexpressie van CD45 op myeloblasten wordt weergegeven in een ratio, d.w.z dat de peakvalue van de CD45 expressie van lymfocyten (zie histogrammen) wordt gedeeld door de peakvalue van de CD45 expressie van myeloblasten.*

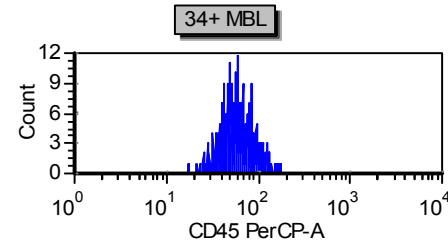
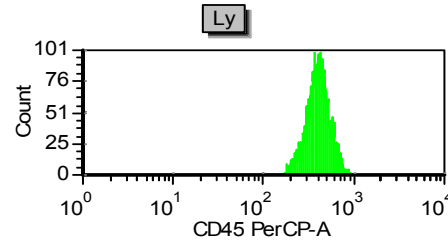
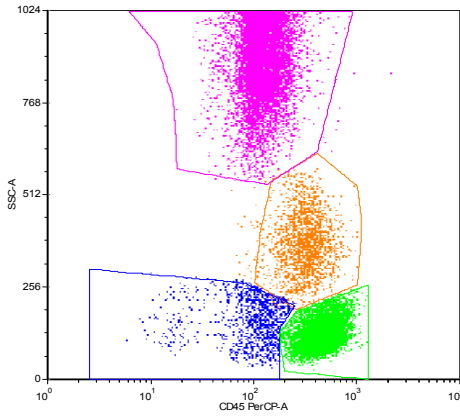
Hypogranulariteit van de myelo-reeks wordt eveneens uitgedrukt in een ratio, hier wordt de peakvalue van de SSC van granulocyten gedeeld door de peakvalue van de SSC van lymfocyten. *

* Normaalwaarden hiervan zijn instituut-afhankelijk.

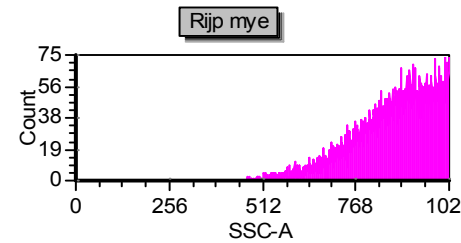
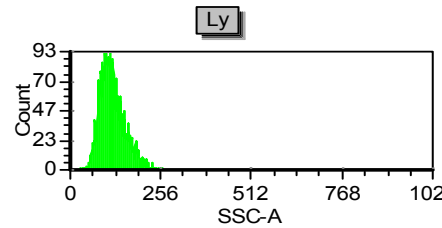
Hypogranulariteit van de myelo-reeks en onderexpressie van CD45 op myeloblasten als parameter.



Normaal beenmerg

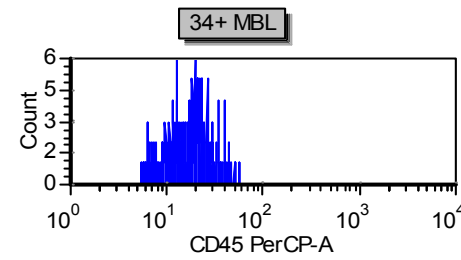
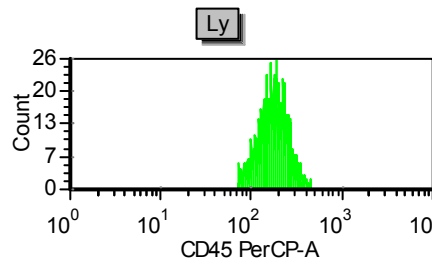
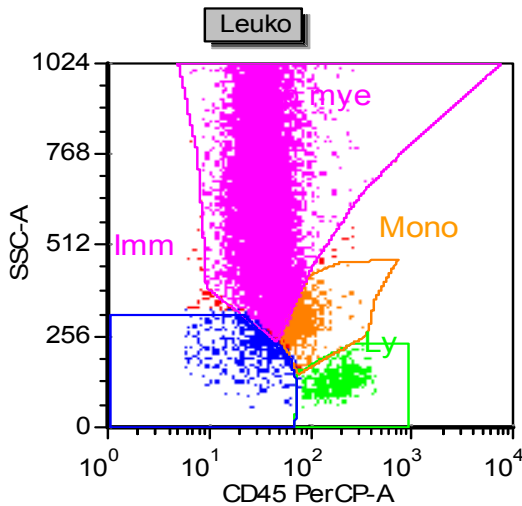


CD45 ratio: 7,1 (6,5 – 8,7)

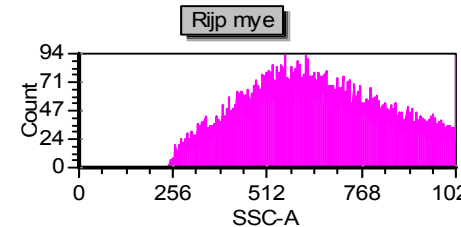
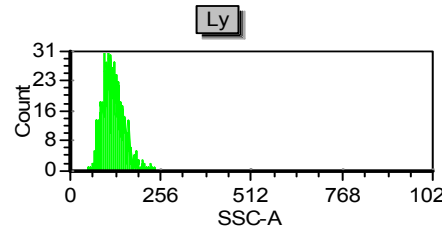


SSC ratio: 10,1 (> 8,9)

MDS beenmerg



CD45 ratio: 10,9 (6,5 – 8,7)

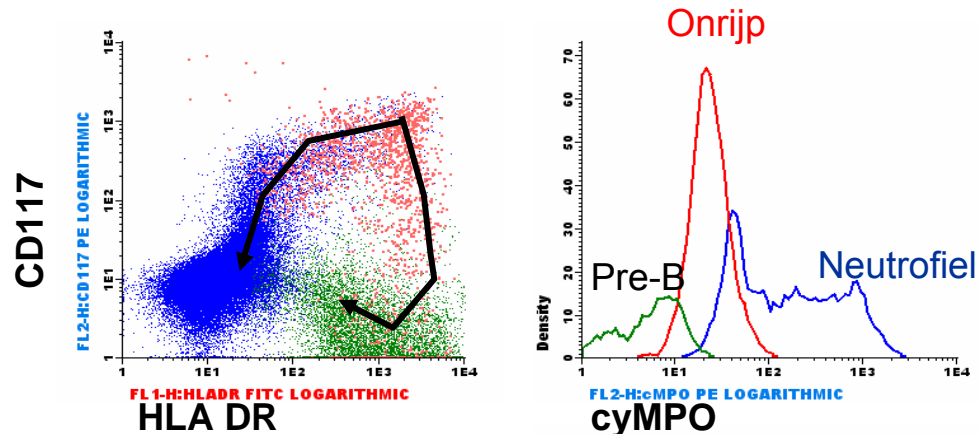


SSC ratio: 6,4 (> 8,9)

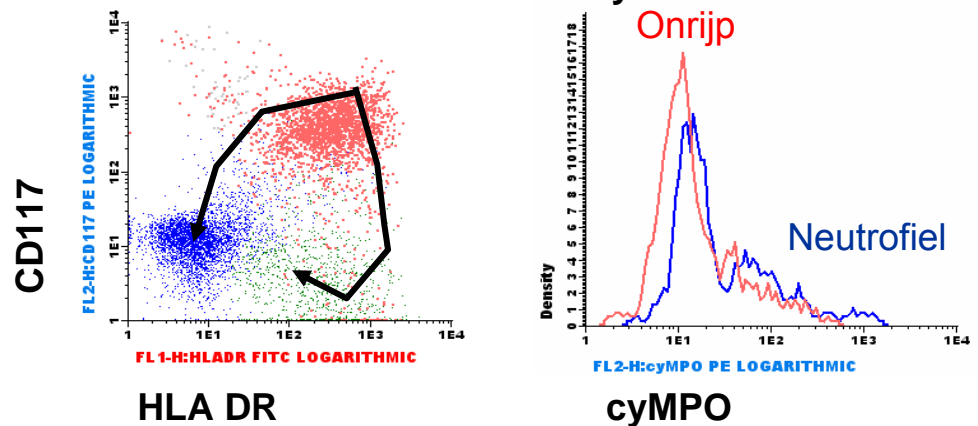
MDS vs normaal BM: myelomonocyttaire uitrijping



Normaal BM

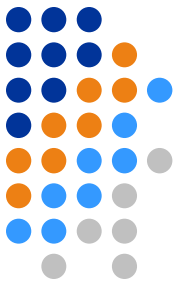


RAEB-1

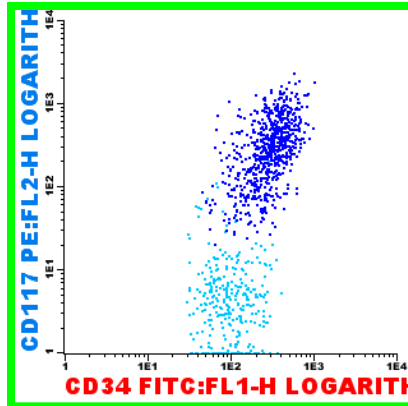


CD117 overexpressie

standaardisatie van interpretatie

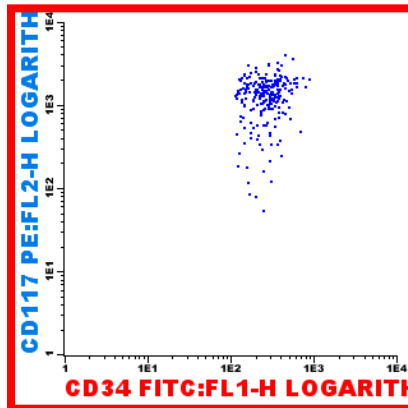
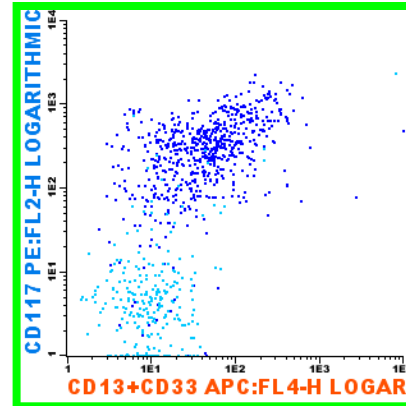


CD34-CD117

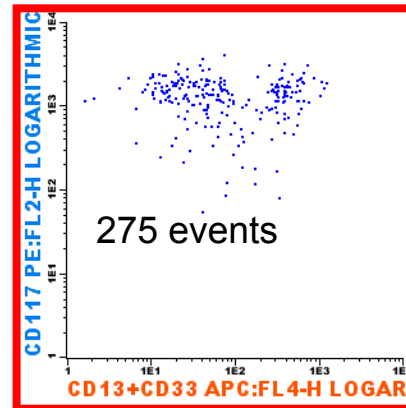


4442

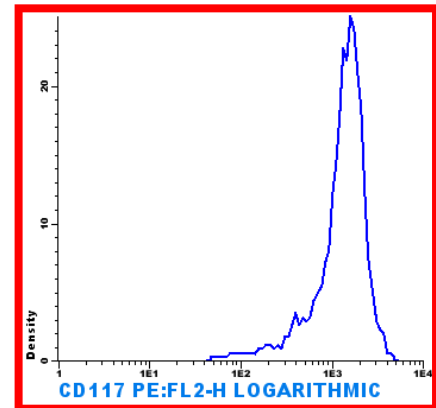
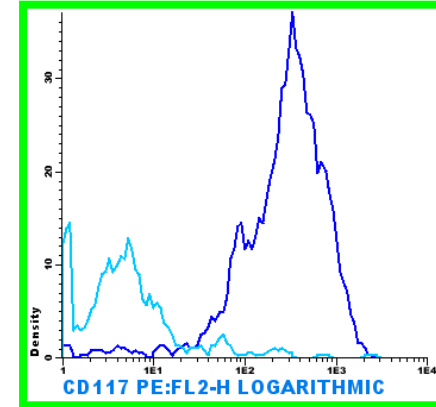
CD13/33-CD117



4406



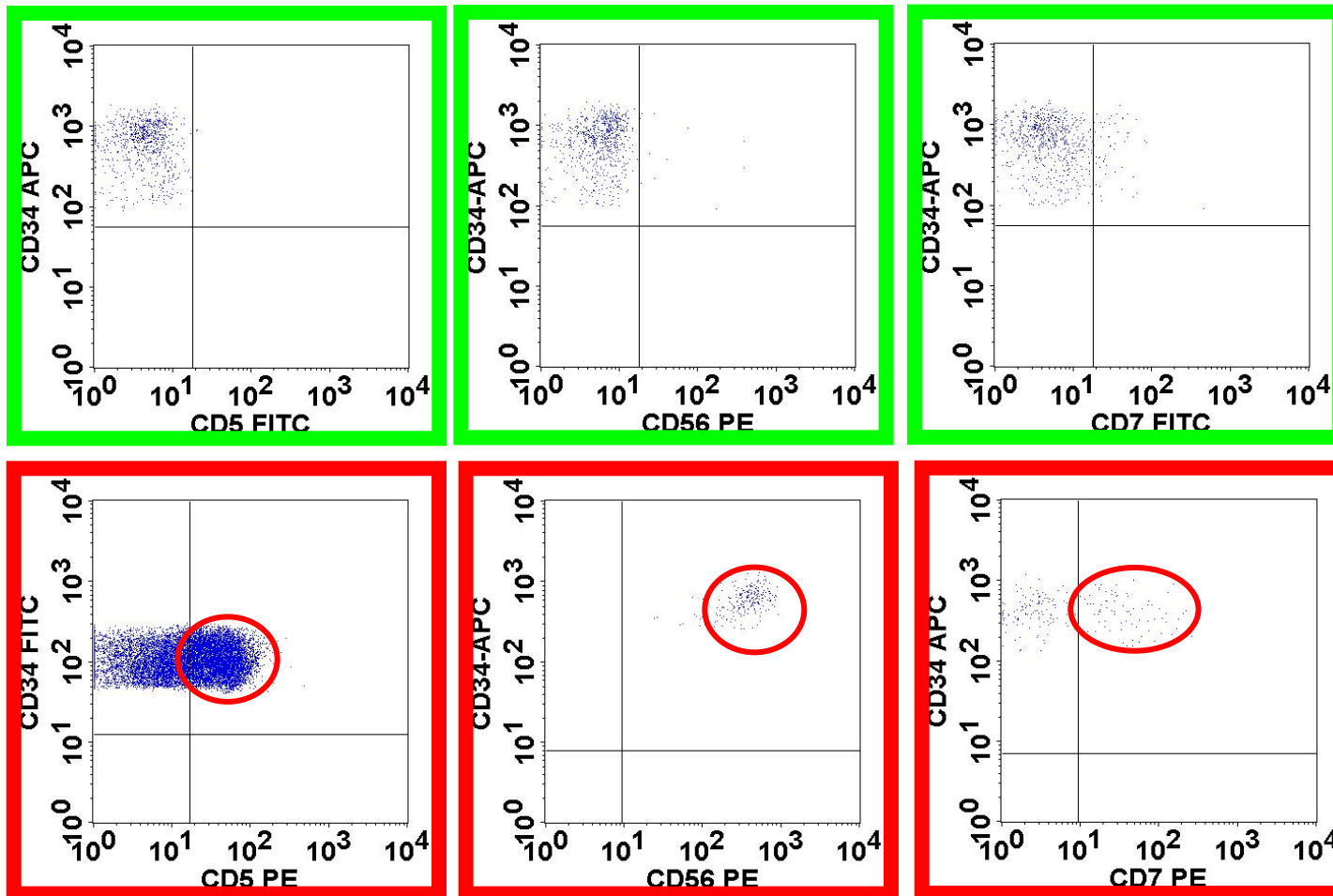
CD117



Myeloïde voorlopercellen

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

Lineage infidelity markers op myeloïde voorlopercellen

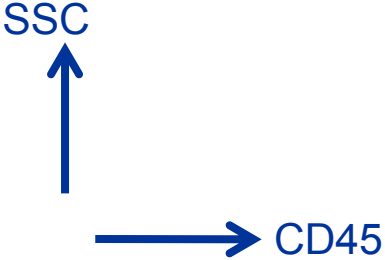
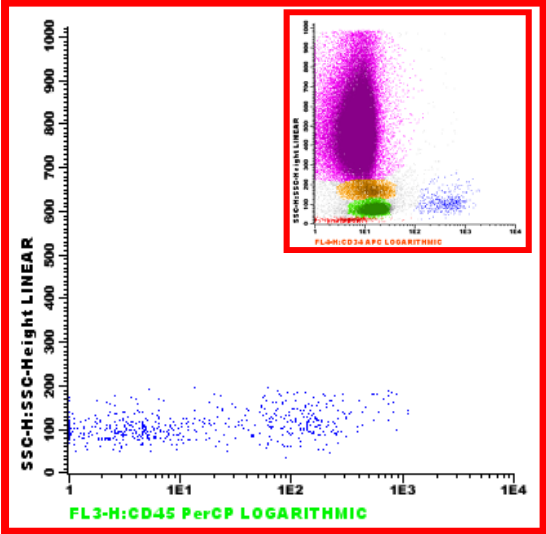
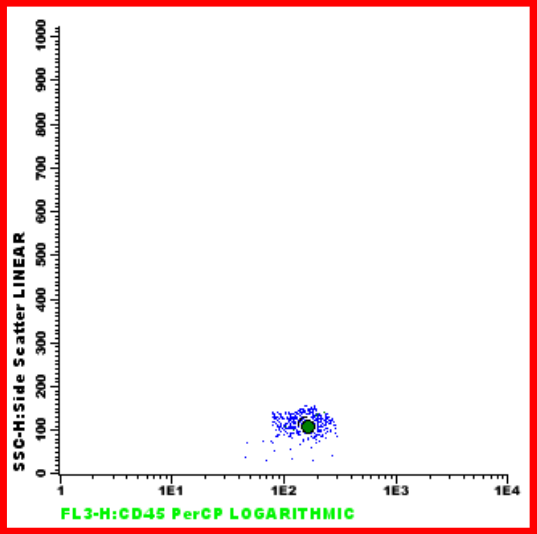
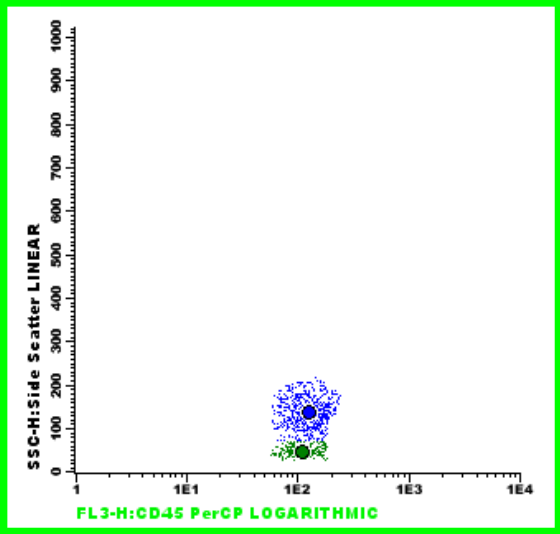


Ca. 40% van de
patienten:

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

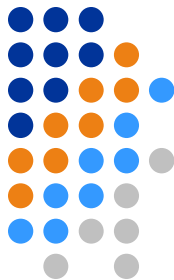


CD5 / CD19 / CD45 / CD34

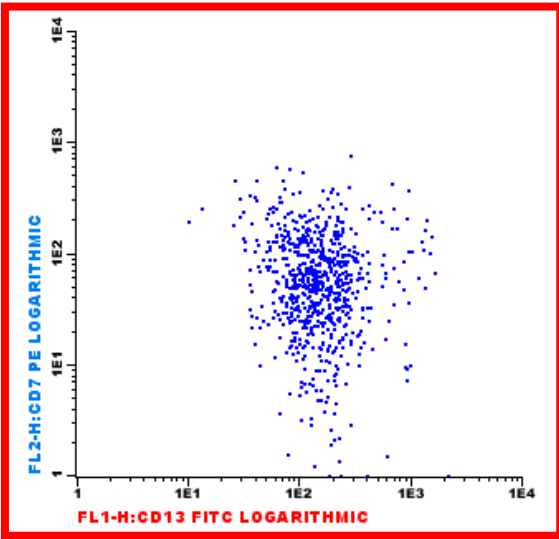
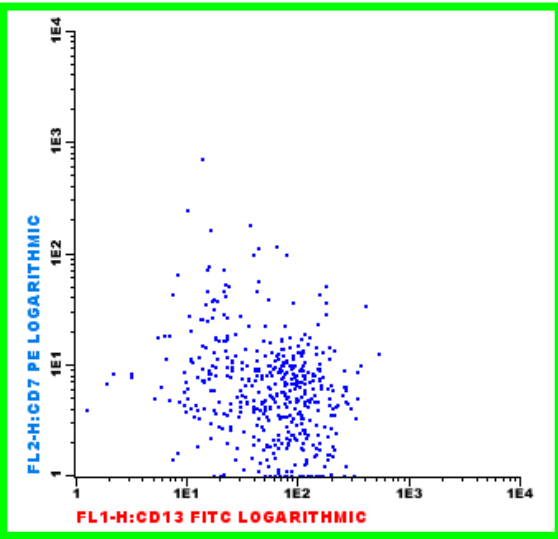


selectie op CD45^{dim} SSC^{low-int}

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



CD13 / CD7 / CD45 / CD34



CD7



CD13



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

Tot slot



- Consensus over antistof combinaties en minimale dataset
- Gebruik standaard gating strategie en verifieer subpopulaties
- Afstemming over interpretatie van afwijkende patronen
- Derhalve is het essentieel om binnen eigen laboratorium setting zoveel mogelijk kennis en expertise te vergaren over uitrijpingspatronen en normaalwaarden van de diverse subpopulaties in normaal beenmerg