

Postanalytische aspecten van immunofenotyperings-onderzoek in kader van hemato-oncologische diagnostiek

- Een overzicht van gepubliceerde data en ervaring van experts uit het veld -

1. Doel

Het beschrijven van post-analytische aspecten van immunofenotypering, zoals de interpretatie en conclusies die men kan afleiden uit de analyse van een flowcytometrische bepaling. Ook de rapportage speelt hierbij een belangrijke rol.

2. Beginsel

Bij de beschrijving van de post-analytische aspecten is gebruik gemaakt van de meest recente literatuur, als ook de al aanwezige relevante richtlijnen van de VHL, SKML en NVC. Het omvat een overzicht van peer-reviewed literatuur maar ook die van expert-opinions op dit terrein. Onder de scope van dit document vallen de immunofenotypische analyses uitgevoerd in perifere bloed, lichaamsvochten, weefselbiopten en/of beenmergaspiraten in het kader van de hemato-oncologische diagnostiek, zoals bij verdenking van:

- leukemie/lymfoom
- plasmacelafwijkingen (multipel myeloom, MGUS, plasmacelleukemie en amyloidose)
- myelodysplasie
- mastocytose

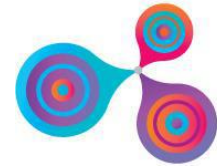
Ook de bepaling van lymfocytensubsets (bijv. in het kader van onderzoek van bronchoalveolair lavage, immuun status of HIV-onderzoek) valt onder deze scope.

Bij genoemde onderzoeken zijn kennis, ervaring en expertise noodzakelijk. De aspecten waaraan interpretatie en conclusie dienen te voldoen zijn reeds deels beschreven in de aanbevelingen/richtlijnen van de VHL, SKML of NVC (zoals vermeld in 6. Referenties). In dit document worden nog ontbrekende aspecten toegevoegd.

3. Definities/Afkortingen

BM	Beenmerg
CLL	Chronische Lymfatische Leukemie
CMML	Chronische Myelomonocyttaire Leukemie
FMH	Foetale maternale hemorrhage
K ₂ EDTA	Dikaliummethyleendiamine-tetra-acetaat
kT	Kamertemperatuur
Na-heparine	Natrium-heparine
MBL	Monoklonale B-lymfocytose
MGUS	Monoclonal gammopathy of undetermined significance
NK	Natural killer-cell
NVC	Nederlandse Vereniging voor Cytometrie
PB	Perifere bloed
SKML	Stichting Kwaliteitsbewaking Medisch Laboratoriumonderzoek
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
T-LGL	T-Large Granular Lymfocytic Leukemia
VHL	Vereniging van Hematologisch Laboratoriumonderzoek
WHO	World Health Organization

4. Toepassingsgebied



Alle analyses uitgevoerd op patiëntmateriaal aangeboden ten behoeve van immunofenotypering in het kader van hematologische, immunologische en hematologische diagnostiek.

5. Post-analytische aspecten

Aanbevelingen benoemen subpopulaties

Perifeer bloed, lichaamsvochten, weefselbiopten en/of beenmergaspiraten:

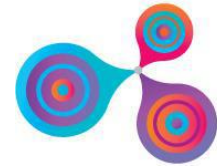
- Minimaal aantal te analyseren events: om een gedegen uitspraak te kunnen doen over een subpopulatie of een afwijkende celpopulatie, dient deze minimaal 100 events te bevatten. Dit is met name van belang om eventuele aberrante expressie te kunnen vaststellen en benoemen. Wanneer de afwijkende populatie maar 20-100 events groot is, dient deze populatie qua scatter en immunofenotype in een duidelijk cluster te liggen. Wanneer de afwijkende populatie van 20-100 events geen duidelijke clustering laat zien, of wanneer deze populatie kleiner dan 20 events groot is, dient er een opmerking bij geplaatst te worden dat het cel aantal te laag is voor een betrouwbare analyse.
- Indien niet voldaan kan worden aan het hierboven benoemde minimaal aantal te analyseren cellen, dan dient er een voorbehoud gemaakt te worden ten aanzien van de conclusie in de rapportage.
- Bij immunofenotypering van perifeer bloed, dient bij diagnose, bij voorkeur de immunologische dif (relatieve omvang van de granulocyten, monocyten en lymfocyten (inclusief subtypering B-, T- en NK-lymfocyten) gerapporteerd te worden.
- Immunologische dif van perifeer bloed: in de hemato-oncologische maligniteiten waarbij in de WHO2017 een absoluut minimaal aantal afwijkende cellen genoemd wordt, zal de absolute omvang van de afwijkende celpopulatie bepaald dienen te worden (bv. MBL, CLL, T-LGL en CMML). Dit kan zowel via single (beads) of dual platform (d.m.v. een combinatie van de hemocytometrische kwantificering en de immunofenotypisch bepaalde relatieve fractie, allen binnen de relevante leukocyten subpopulatie).

Voorbeeld:

Voor de diagnose B-CLL wordt er in de WHO2017 een absolute omvang van $5 \times 10^9/L$ monoclonale B-lymfocyten als ondergrens genoemd. Om dit te kunnen vaststellen zal het relatief aantal monoclonale B-lymfocyten zoals bepaald met immunofenotypering vermenigvuldigd dienen te worden met het absoluut aantal lymfocyten, bv. zoals bepaald met de routine-hemocytometer.

Aandachtspunten:

- Het rapport dient minimaal de informatie te bevatten zoals benoemd in de ISO-15189 richtlijn.
- Daarnaast dient minimaal vermeld te worden wat de aard van het materiaal is en de vraagstelling (bijvoorbeeld lokalisatie lymfoom, anemie eci etc).
- In verband met de verscheidenheid aan laboratorium informatie systemen (LIS)- als ook ziekenhuisinformatiesystemen (ZIS), mag het laboratorium zelf een keuze maken voor de wijze van rapporteren. Dit kan in vrije tekst of in tabelvorm of als pdf.
- De rapportage van een immunofenotypisch gevonden afwijking dient tenminste de markers van de minimale panels te omvatten, zoals vastgesteld in de richtlijnen van de NVC. Daarnaast alle relevante markers voor de behandeling van de patiënt.
- De rapportage van het percentage en de sterkte van de expressie van genoemde markers dient te geschieden conform de richtlijnen van de NVC. Hierbij dient zoveel als mogelijk de CD-nomenclatuur gevolgd te worden.



- Indien de aangekleurde antigeen-expressie niet membraangebonden is, maar bijvoorbeeld intracellulair dan dient dit in een prefix aangegeven te worden (bv. cy-CD79a.)
- Bij een eventueel mogelijke MDS dient minimaal het percentage CD34-positieve cellen gerapporteerd te worden
- Ten aanzien van de kwaliteit van het geanalyseerde beenmergaspiraats is het aan te bevelen om de representativiteit (de mate van bloedbijmenging) te berekenen of aanwezigheid van mestcellen te bekijken (CD117++/SSC med-high) of anders.
- Elke mogelijke interferentie met de kwaliteit van het monster dient vermeld en beschreven te worden in het rapport (dry-tap, niet-representatief materiaal, bloedbijmenging).
- Het rapport dient een samenvatting te bevatten van de bevindingen en interpretatie. Eventueel ook een differentiaal-diagnose, mogelijke aanbevelingen voor additionele relevante tests (bv. histochemie (congorood kleuring bij amyloidose), moleculair (bv Jak-2 mutatie analyse) of cytogenetisch onderzoek).
- Indien er een integrale conclusie wordt geformuleerd aan de hand van diverse flowcytometrische antigeenbepalingen dient het rapport ook de naam en functie te bevatten.

6. Literatuur

- 1 Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A. U.S.-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry* 1997; 30: 214-30.
- 2 Johansson et al. Guidelines on the use of multicolour flow cytometry in the diagnosis of haematological neoplasms. *Brit J Haematol.* 2014; 165: 455-88.
- 3 Richtlijn NVC/SKML: minimale panels (immunologische markers). Website www.cytometrie.nl- richtlijnen
- 4 Toelichting minimale panels JUNI 2012. Website www.cytometrie.nl- richtlijnen
- 5 Beoordeling positieve markers. Website www.cytometrie.nl- richtlijnen
- 6 SIHON/NVC scorings systeem, Website www.cytometrie.nl- richtlijnen
- 7 BAL consensus protocol, NVC werkgroep BAL (www.cytometrie.nl)