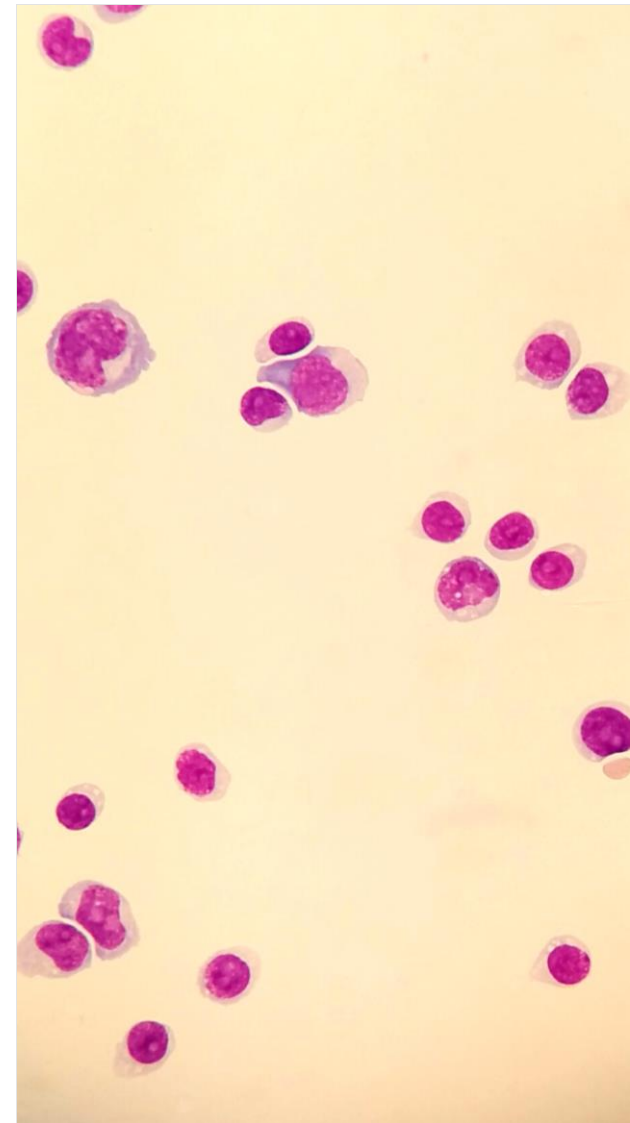


Laboratoriumdiagnostiek van leptomeningeale invasie door lymfoproliferatief proces

ASO Helena Claerhout

Promotor Prof. Dr. N. Boeckx

16 februari 2016



CAT
Laboratoriumdiagnostiek
van leptomeningeale
invasie door
lymfoproliferatief proces

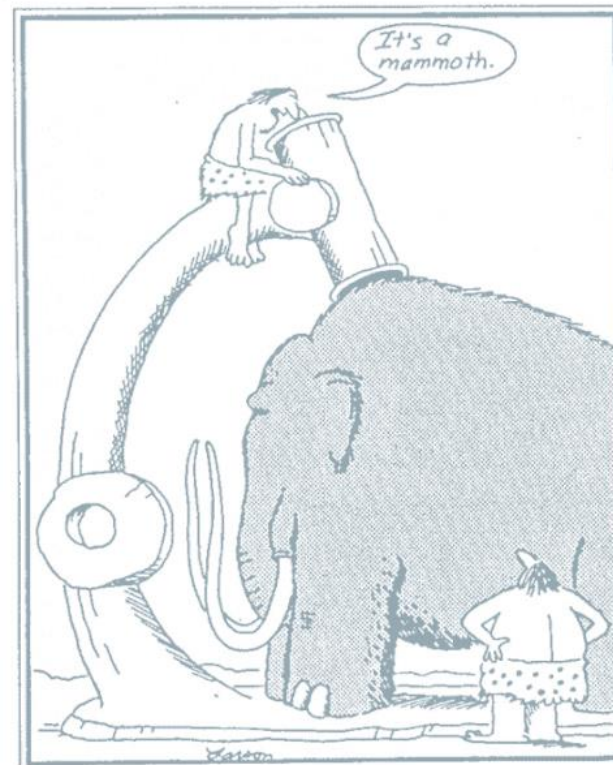
- Inleiding
- Vraagstelling / appraisal
 - 1. Hoe belangrijk is laboratoriumdiagnostiek in leptomeningeale invasie door lymfoproliferatieve aandoeningen?
 - 2. Wat is de meerwaarde van flowcytometrische immuunfenotypering van cellen in cerebrospinaal vocht?
 - 3. Flowcytometrie op cerebrospinaal vocht: is er nood aan (pre-) analytische verbetering?
- Besluit
- To do/action

Inleiding

- Leptomeningeale invasie:
 - Niet frequent, ↓ prognose
 - Patroon: leptomeningeaal - hematogeen- nodulaire depositie
 - Toenemende incidentie
 - CNS profylaxe?
 - Diagnose
 - Risico +/- 4,2%
~ type (5% DLBCL – 30% BL), leeftijd (<60j), pleocytose, ≥1 extranodale localisatie, LDH,...

CAT
Laboratoriumdiagnostiek
van leptomeningeale
invasie door
lymfoproliferatief proces

1. Hoe belangrijk is laboratoriumdiagnostiek in leptomeningeale invasie door lymfoproliferatieve aandoeningen?



Early microscope

Hoe belangrijk is
laboratoriumdiagnostiek in
leptomeningeale invasie door
lymfoproliferatieve
aandoeningen?

Biochemie

- LDH ↑ ~ CNS recurrence
- Beta-2 microglobuline serum ↑
 - >4 mg/dL ~ Lower survival in ALL
- Beta-2 microglobuline CSV ↑
- Totaal eiwit CSV ↑
- Hypoalbuminemia
 - <35 g/dL ~ CNS recurrence

- Andere: CSV glucose (<40 mg/dL), Beta-glucuronidase, sCD27 (CSV), LDH iso-enzyme 5, CXCL13, IL10, sCD19

Hoe belangrijk is
laboratoriumdiagnostiek in
leptomeningeale invasie door
lymfoproliferatieve
aandoeningen?

Cytologie

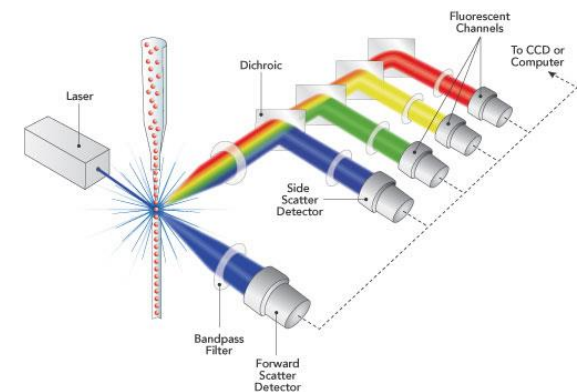
- Cytospin - MGG kleuring - Microscopie
- Hoge specificiteit
- Lagere sensitiviteit
- Limiterende factoren: # WBC/ μ L, maligne vs. reactief
- Lage detectiegraad -> multipele puncties



Hoe belangrijk is laboratoriumdiagnostiek in leptomenigeale invasie door lymfoproliferatieve aandoeningen?

Flow cytometrie

- Detectie granulariteit (SSC) en celvolume (FSC)
- Immuunfenotypering: surface, cytoplasmatische, nucleaire antigenen
- Detectie van zeer lage aantallen cellen
- Limiterende factoren: #WBC/ μ L, staalvolume, pre-analyse



Hoe belangrijk is
laboratoriumdiagnostiek in
leptomeningeale invasie door
lymfoproliferatieve
aandoeningen?

Anatomopathologie

- Primaire CNS lymfomen
- Stereotactische biopsie
- Morfologie en immuunfenotypering

CAT
Laboratoriumdiagnostiek
van leptomeningeale
invasie door
lymfoproliferatief proces

2. Wat is de meerwaarde van flowcytometrische immuunfenotypering van cellen in cerebrospinaal vocht?



Wat is de meerwaarde van flowcytometrische immuunfenotypering van cellen in cerebrospinaal vocht?

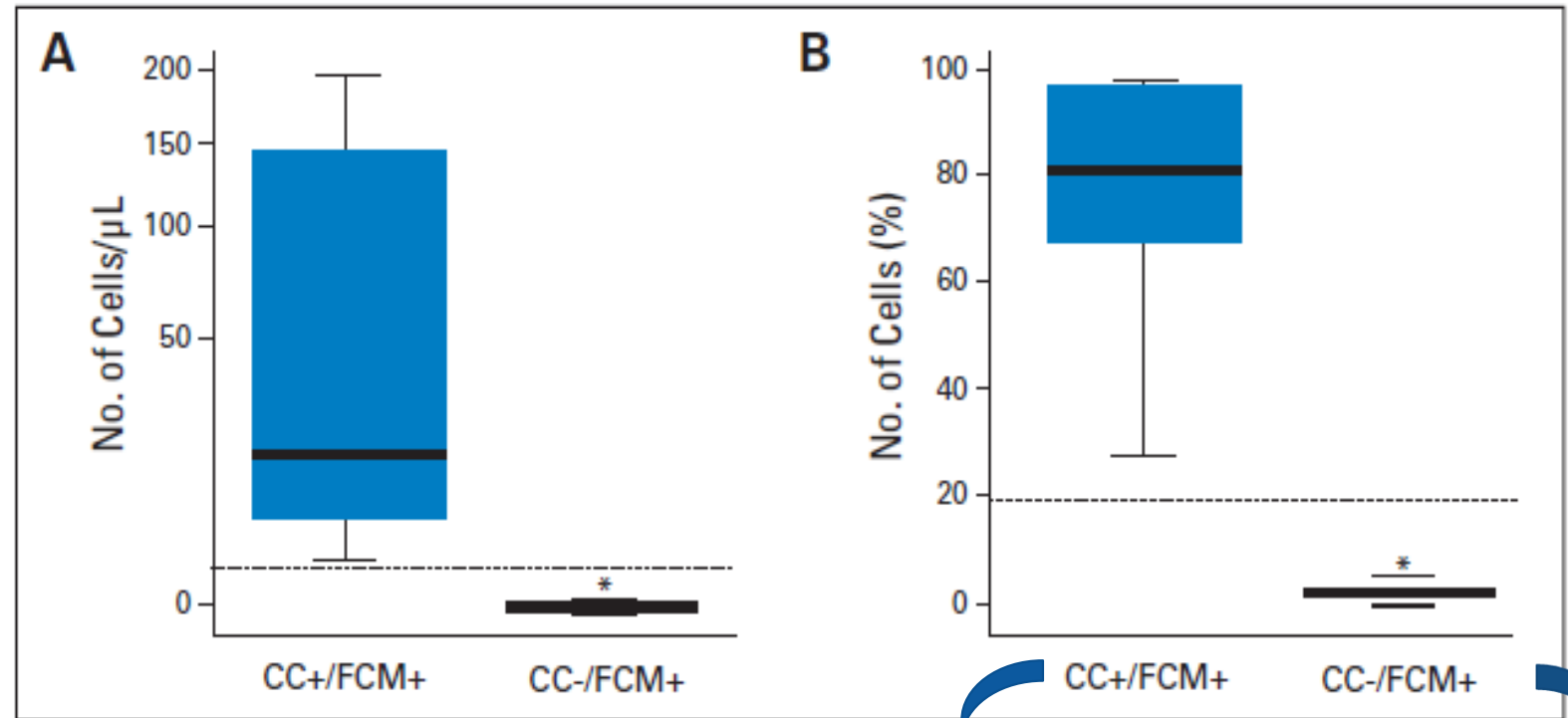
- Toegenomen sensitiviteit (en specificiteit)
- Hogere absolute WBC telling en percentage neoplastische B-cellen FCM+/CC+ t.o.v. FCM+/CC-
- Progression free survival: FCM-/CC- > FCM+/CC+

Toegenomen sensitiviteit

| Study | Number | Positive FCM (%) | Positive CC (%) | Study population |
|---|--------|----------------------------|--------------------------------|--|
| Hedge <i>et al.</i> 2005 ⁶ | 51 | 11 (22%) | 1 (2%) | High risk CNS disease: <ul style="list-style-type: none"> - DLBCL with either ≥ 2 extranodal sites and elevated LDH or BM involvement - BL - Aids-related lymphoma |
| Quijano <i>et al.</i> 2009 ¹¹ | 123 | 27 (22%) | 7 (6%); suspicious in 3 (2%) | High risk CNS disease: <ul style="list-style-type: none"> - Aggressive B-NHL with infiltration of extranodal sites (testis, breast, paranasal sinus, and/or BM), neurological symptoms or elevated LDH. |
| Alvarez <i>et al.</i> 2012 ²⁶ | 114 | 14 (12%) | 1 (<1%) | DLBCL patients at diagnosis (n=95) or at relapse (n=19) |
| Benevolo <i>et al.</i> 2012 ⁵ | 174 | 18 (10%) | 7 (4%) | Aggressive B-NHL |
| Bromberg <i>et al.</i> 2007 ¹² | 219 | 44 (73% of 60; 20% of 219) | 19 (32% of 60; 9% of 219) | Patients with CSF evaluation for haematological malignancy: DLBCL (n=55), precursor B-lymphoblastic leukemia/lymphoma (n=37), BL (n=8), other B-NHL (n=50), AML (n=40), CML (n=7), other (n=22) |
| Di Noto <i>et al.</i> 2008 ²⁷ | 42 | 11 (26%) | 4 (9.5%) | High risk CNS disease: <ul style="list-style-type: none"> - DLBCL, Blastoid MCL, B-LBL, or T-LBL with either ≥ 2 extranodal sites and elevated |
| Schinstine <i>et al.</i> 2006 ²⁸ | 32 | 19 (59%) | Repeat cytology: 9 (47% of 19) | Patients with initial 'atypical' or 'suspicious' CSF evaluation, followed during 1 year: ALL, B-cell lymphoma, BL, CLL, PCNSL, DLBCL, FL, gamma-delta T-cell lymphoma, HIV-NHL, HTLV-1 leukemia/lymphoma, Mycosis fungoides, T-cell lymphoma/neoplasm. |

Wat is de meerwaarde van flowcytometrische immuunfenotypering van cellen in cerebrospinaal vocht?

Verskil in absolute en relatieve aantallen neoplastische B-cellen in CSV

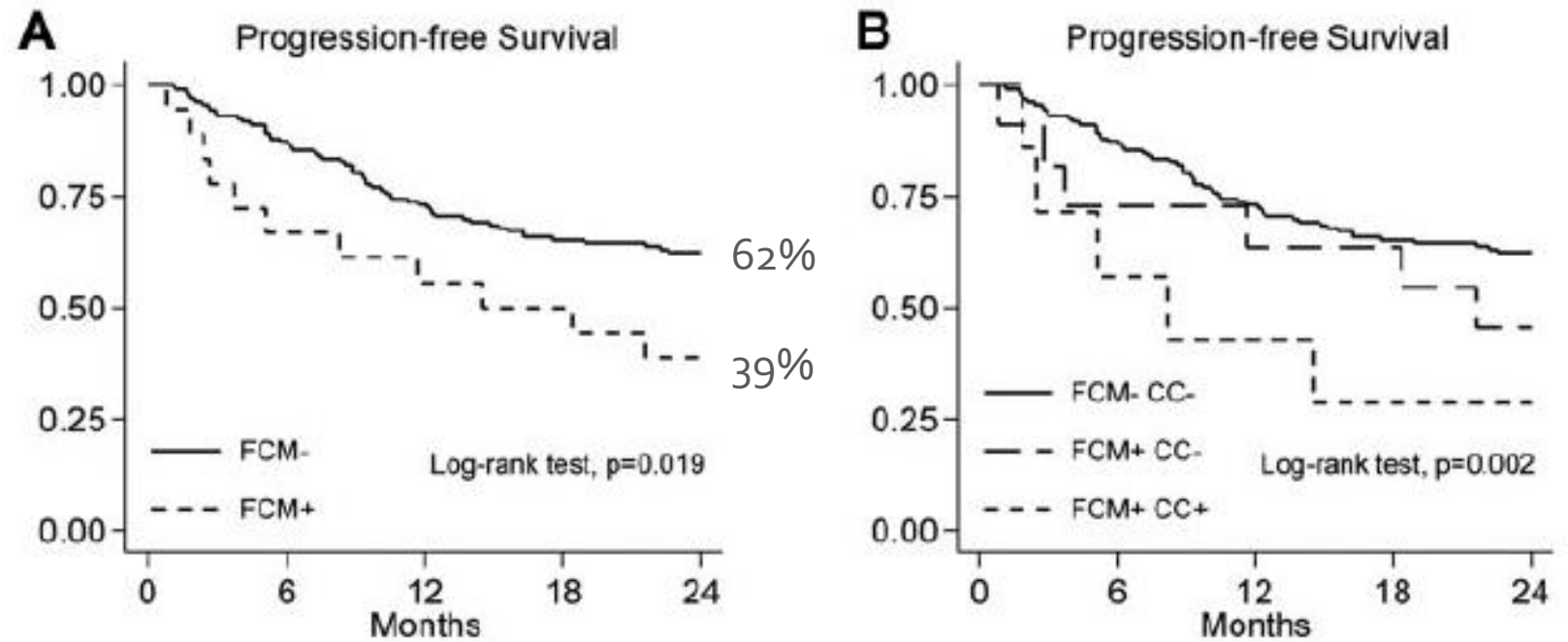


Cut-off CC-/FCM+ en CC+/FCM+:
>20% en ≥ 1 neoplastische B-cel/ μ L

75% neoplastische B-cellen [28%-99%]
5% neoplastische B-cellen [0,1%-23%]

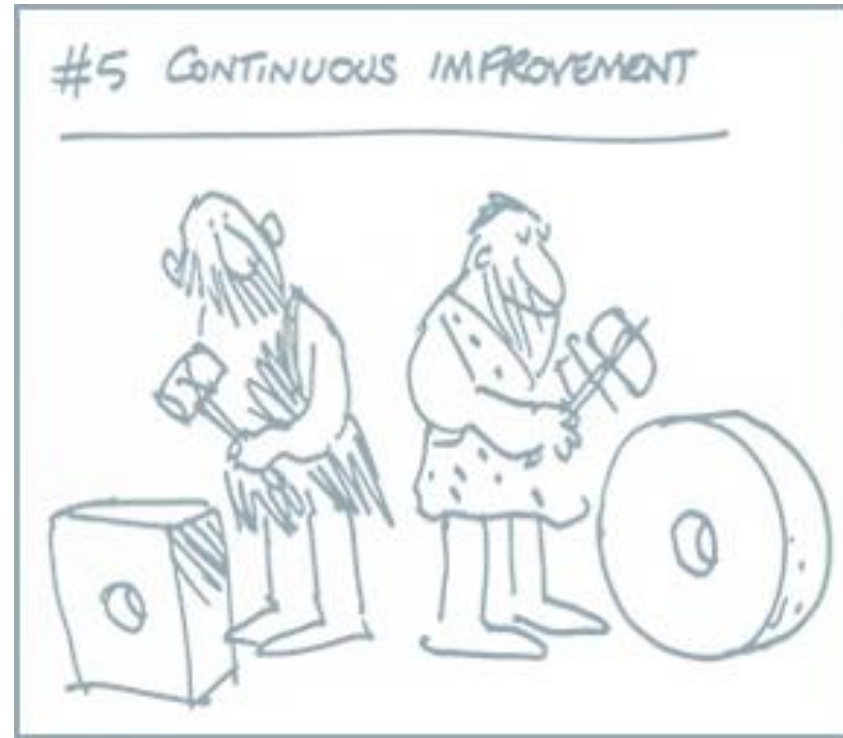
Wat is de meerwaarde van flowcytometrische immuunfenotypering van cellen in cerebrospinaal vocht?

Progression-free survival



CAT
Laboratoriumdiagnostiek
van leptomeningeale
invasie door
lymfoproliferatief proces

3. Flowcytometrie op cerebrospinaal vocht: is er nood aan (pre-) analytische verbetering?



Flowcytometrie op
cerebrospinaal vocht: is er
nood aan (pre-) analytische
verbetering?

Limieten

- Lage cytose
- Beperkt staalvolume
- Snel verlies van cellen
- Perifeer bloed contaminatie
- Detectie van monoclonale B-celpopulatie

Flowcytometrie op
cerebrospinaal vocht: is er
nood aan (pre-) analytische
verbetering?

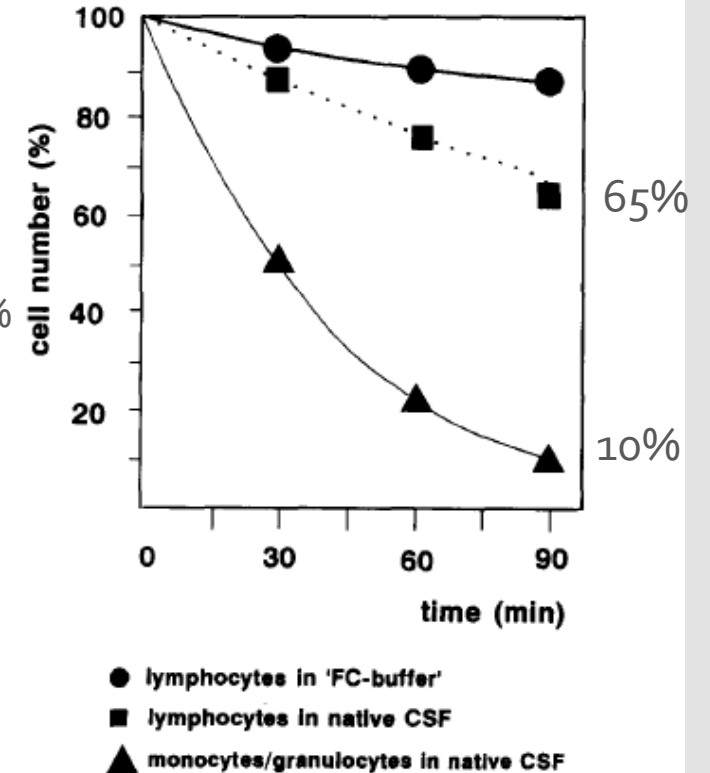
Lage cytose en beperkt staalvolume

- Cut-off: 5 WBC / μ L in CSV
- >5 WBC/ μ L-> identificatie B, CD4+ T, CD8+ T lymfocyten
- Min CSV volume: 0,5-4mL
- 2mL voldoende, 5-10mL voor lage cytose en 'rare event' detectie

Flowcytometrie op
cerebrospinaal vocht: is er
nood aan (pre-) analytische
verbetering?

Snel verlies van cellen in CSV

- Snel verlies tijdens 1^{ste} 60 min
- Dux *et al.*
Na 90 min:
 - reductie van lymfocyten tot 65% in CSV
 - reductie monocyten, neutrofielen tot 10%
- De Graaf *et al.*:
56% lymfocyt survival na 5u



Dux *et al.* J Neurol Sci 1994;121:74-8.

De Graaf *et al.* J Neurol 2011;258:1507-12.

Flowcytometrie op
cerebrospinaal vocht: is er
nood aan (pre-) analytische
verbetering?

Perifeer bloed contaminatie

- Oorzaken:
 - Traumatische punctie
 - Bloeding centraal zenuwstelsel
- Contaminatie?
 - Berekenen toegevoegde WBC:
 - $WBC\ added = \frac{WBC\ blood}{RBC\ blood} \times RBC\ csf$
 - Berekenen van aantal RBC/WBC
 - >1000 RBC/WBC = contaminatie

Perifeer bloed contaminatie

- WBC differentiatie

| Subset | Absolute number of cells CSF ^{14,a} | Absolute number of lymphocyte subsets CSF ^{35,a} | Percentage cells/all WBC CSF ¹⁴ | Percentage cells/lymphocytes CSF ³⁴ | Percentage cells/lymphocytes PB ³⁴ |
|-----------------|--|---|--|--|---|
| Leukocytes | 1.12 (0.40-3.17) | | 100% | | |
| Granulocytes | 0.08 (0.02-0.43) | | 7% | | |
| Monocytes | 0.23 (0.08-1.11) | | 21% | | |
| Lymphocytes | 0.66 (0.16-1.88) | | 59% | 100% | 100% |
| T cells | 0.62 (0.15-1.83) | 0.46 (0.2-2.02) | 55% | 97% | 74% |
| CD4+ T cells | 0.44 (0.08-1.43) | 0.34 (0.12-1.36) | 55% | 76% | 63% |
| CD8+ T cells | 0.13 (0.04-0.40) | 0.13 (0.06-1) | 39% | 24% | 37% |
| NKT cells | 0.01 (0.00-0.06) | 0.005 (0-0.037) | <1% | 3.5% | 6.7% |
| B cells | 0.00 (0.00-0.06) | 0.005 (0-0.034) | <1% | 0.8% | 14% |
| NK cells | 0.01 (0.00-0.05) | 0.011 (0.002-0.058) | <1% | 2.2% | 12% |
| Dendritic cells | 0.04 (0.01-0.18) | | 4% | | |
| Myeloid | 0.02 (0.00-0.13) | | 2% | | |
| Plasmacytoid | 0.01 (0.00-0.03) | | <1% | | |

Flowcytometrie op cerebrospinaal vocht: is er nood aan (pre-) analytische verbetering?

Flowcytometrie op
cerebrospinaal vocht: is er
nood aan (pre-) analytische
verbetering?

Monoclonale B-cel populatie

- Monoclonale B-cel populatie in CSV
- Kappa/Lambda ratio bij CD19+ B-lymfocyten
- Cave:
 - Carry-over \leftrightarrow wassen
 - Vrije immuunglobulines \leftrightarrow dilutie met wasbuffer
 - Variatie in cut-off kappa/lambda ratio
 - Bv. Kappa/lambda ratio $\geq 2 \rightarrow$ Sp 92,3%, Se 73,1%
- Toegenomen kappa/lambda ratio \rightarrow suggestief voor monoclonale B-cel populatie
- Diagnose B-NHL in CSV:
monoclonale B-cel populatie + expressie van additionele merkers

Flowcytometrie op
cerebrospinaal vocht: is er
nood aan (pre-) analytische
verbetering?

Kwaliteitsverbetering

- Pre-analyse
 - Celverlies verhinderen
 - Transport
 - Centrifugatie
 - Stabiliserende media
 - Protocol voor staalcollectie
- Analyse
 - Twee stappen protocol
 - Keuze antistoffenpanel
 - sCD19

Flowcytometrie op
cerebrospinaal vocht: is er
nood aan (pre-) analytische
verbetering?

Pre-analyse

- Challenge = significant verlies 1ste 30 min-60 min
- Transport KT naar labo + analyse binnen 1u
- Stabilisatie van vocht
- Centrifugatie 15min x 200g, 4°C

Flowcytometrie op
cerebrospinaal vocht: is er
nood aan (pre-) analytische
verbetering?

Pre-analyse

- Stabilisatiemedia:
 - FCM buffer (o.a. PBS, BSA):
 - Na 90 min: overleving 90% (lymfocyten)
 - Earle's balanced salt solution + serum albumine:
 - Preventie celverlies gedurende 24u
 - RPMI 1640:
 - Preservatie tenminste 5u na afname, tot 18u
 - Voldoende cellen:
30% stalen (niet-gestabiliseerd) <-> 94% stalen (gestabiliseerd)
 - Transfix:
 - Stabilisatie WBC en antigenen

Flowcytometrie op
cerebrospinaal vocht: is er
nood aan (pre-) analytische
verbetering?

Pre-analyse

- Transfix:
 - Prospectief, n=99
 - Geen stabilisatie <-> serum-bevattend medium <-> Transfix
 - Flow cytometrie

| <i>t</i> = 30 minutes | Native | | | Total |
|-----------------------|----------|------------|----------|-------|
| | Positive | Suspicious | Negative | |
| TransFix™ | | | | |
| Positive | 21 | 3 | 4 | 28 |
| Suspicious | 2 | 0 | 4 | 6 |
| Negative | 0 | 3 | 62 | 65 |
| Total | 23 | 6 | 70 | 99 |

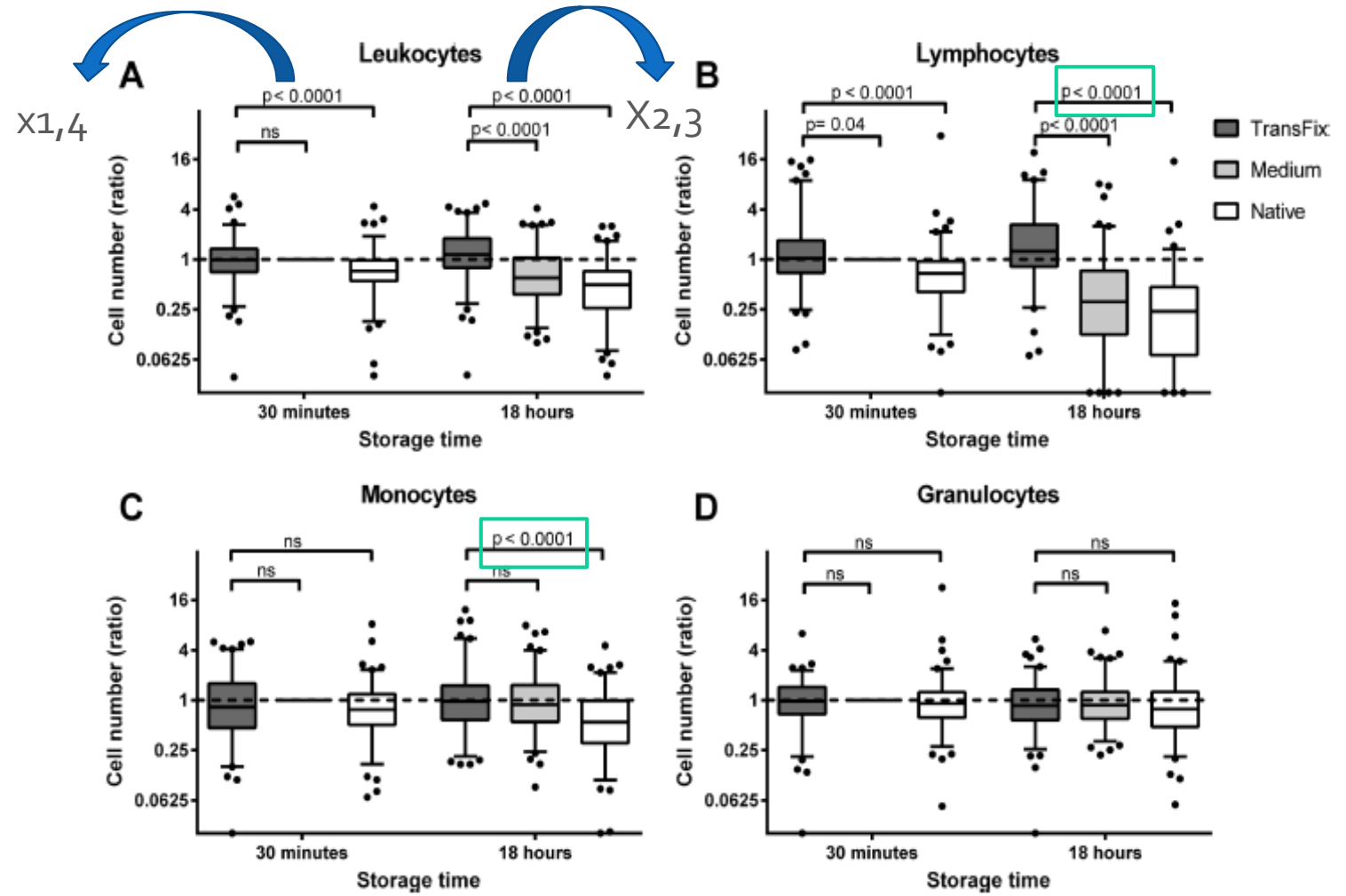
P = 0.23 (McNemar test).

| <i>t</i> = 18 hours | Native | | | Total |
|---------------------|----------|------------|----------|-------|
| | Positive | Suspicious | Negative | |
| TransFix™ | | | | |
| Positive | 23 | 6 | 5 | 34 |
| Suspicious | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Negative | 0 | 0 | 63 | 63 |
| Total | 23 | 6 | 70 | 99 |

P = 0.005 (McNemar test).

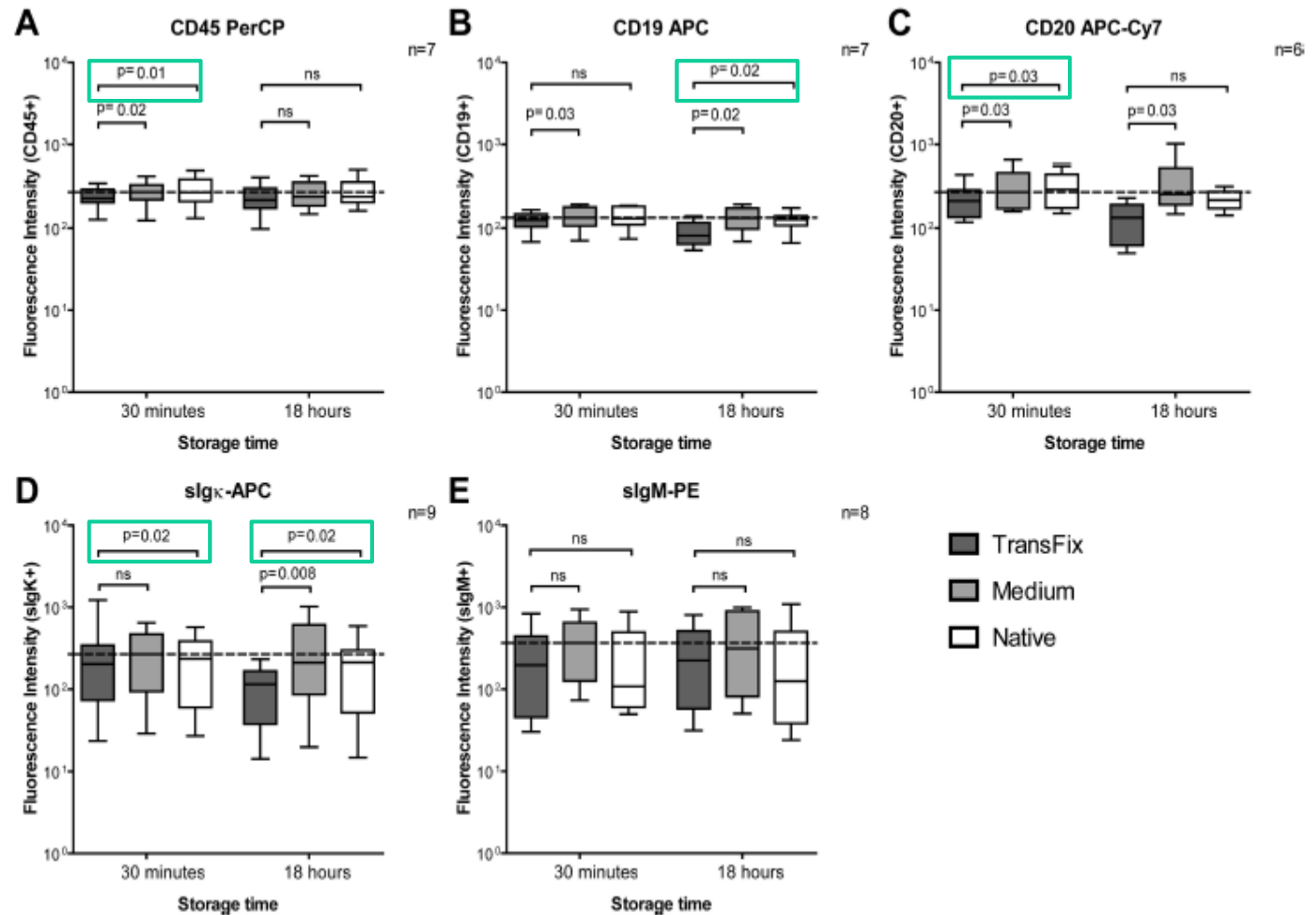
Flowcytometrie op cerebrospinaal vocht: is er nood aan (pre-) analytische verbetering?

- Aantal cellen na 30 min vs 18 u



Flowcytometrie op cerebrospinaal vocht: is er nood aan (pre-) analytische verbetering?

- Verschil in fluorescentie-intensiteit



Flowcytometrie op
cerebrospinaal vocht: is er
nood aan (pre-) analytische
verbetering?

Pre-analyse

Analyse binnen 1u of stabilisatie in RPMI of TransFix:

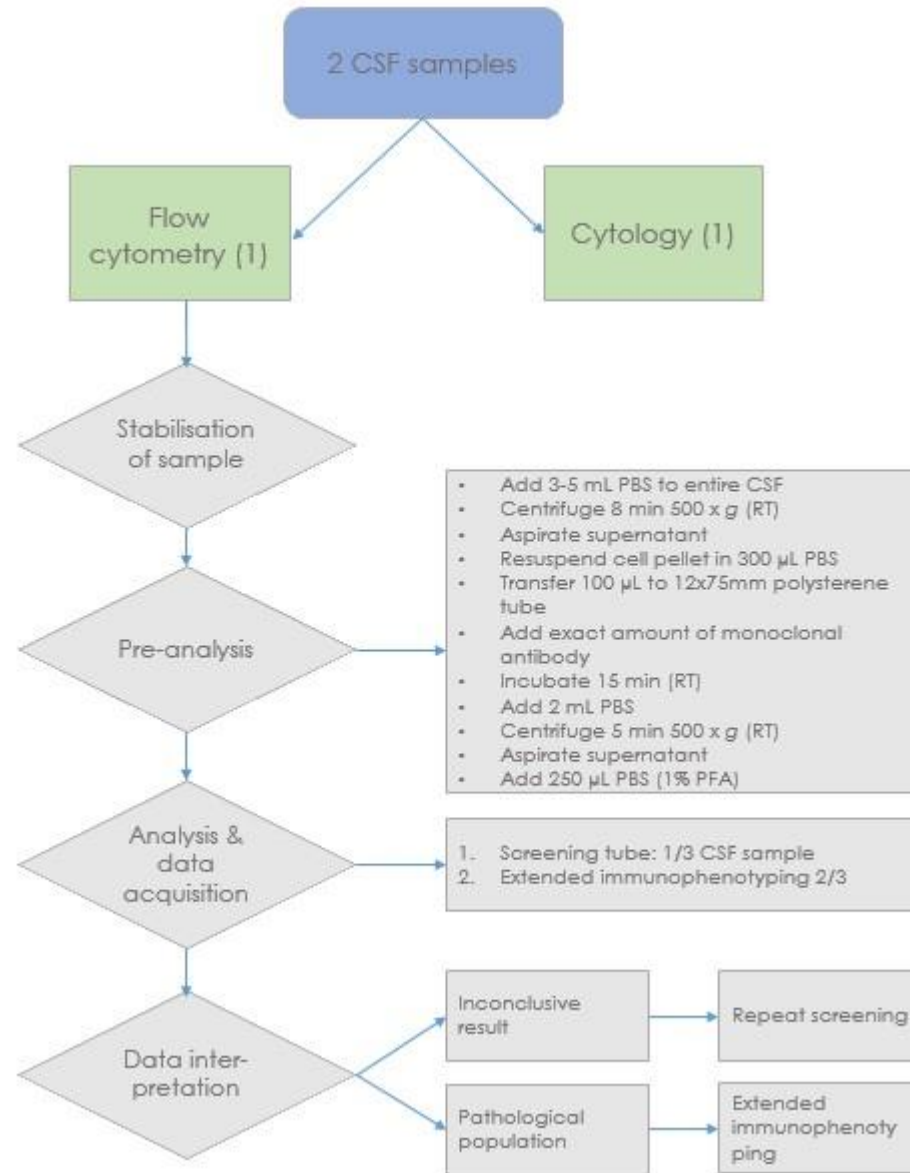
- 1) Collecteer ≥ 2 mL CSV dmv lumbaal punctie en plaats op 4°C
- 2) RPMI: Collecteer CSV in een steriele 15 mL tube met 2 mL RPMI + 5% FBS stabilisatiemedium en bewaar tot 18u op 4°C .
- 3) TransFix: Collecteer CSV in een tube met 0.4 mL TransFix stabilisatiemedium (ratio 1/5) en bewaar 48-72u op 4°C .

Flowcytometrie op
cerebrospinaal vocht: is er
nood aan (pre-) analytische
verbetering?

Analyse

- Twee-stappen:
 - 1/3 van het staal voor screening
 - 2/3 voor uitgebreide immuunfenotypering indien nodig
- Keuze panel voor immuunfenotypering

Flowcytometrie op
cerebrospinaal vocht: is er
nood aan (pre-) analytische
verbetering?



Flowcytometrie op
cerebrospinaal vocht: is er
nood aan (pre-) analytische
verbetering?

Screening 6 kleuren

| Colour | FITC | PE | PerCP Cy5.5 | PE Cy7 | APC | APC Cy7 |
|--------|--------------------|--------------------|-------------|--------|------|---------|
| MoAb | CD8-Smlg lambda | CD56-Smlg kappa | CD4-CD19 | CD3 | CD20 | CD45 |

Quijano *et al.* J clin oncol 2009;27:1462-9.

| Colour | FITC | PE | PCX | PE Cy7 | APC | APC Cy7 |
|---------|--------------------|--------------------|----------|--------|------------|---------|
| Unknown | CD8-Smlg lambda | CD56-Smlg kappa | CD4-CD19 | CD3 | CD20 | CD45 |
| B | Smlg lambda | CDX/IgX | CD19 | CD10 | Smlg kappa | CD45 |
| T | CD5 | CD7 | CD45 | CD4 | CD8 | CD3 |
| AL | CD34 | CD7 | CD45 | CD33 | CD10 | CD19 |
| ALL | CD5 | CD7 | CD45 | CD10 | CD34 | CD19 |

Kraan *et al.* Curr Protoc Cytom 2008;Chapter6:Unit6.25.

Flowcytometrie op
cerebrospinaal vocht: is er
nood aan (pre-) analytische
verbetering?

Screening 8 kleuren

- Small sample tube (SST) Euroflow:
 - Single 8-colour/11 antibody tube
 - 13 parameters (11 Ab + FSC,SSC)

| Colour | PacB | PacO | FITC | PE | PerCP Cy5.5 | PE Cy7 | APC | APC H7 |
|--------|------|------|------------------------|------------------------|----------------|--------|----------------------|--------|
| MoAb | CD20 | CD45 | CD8- Smlg lambda | CD56- Smlg kappa | CD4 | CD19 | SmCD3 and CD14 | CD38 |

Flowcytometrie op
cerebrospinaal vocht: is er
nood aan (pre-) analytische
verbetering?

Soluble CD19

- DLBCL (n=91) en Burkitt lymfoom (n=22)
- Flowcytometrie sCD19
- sCD19 (CSV)
 - ~ neurologische symptomen in DLBCL en BL
 - ~ parenchymaal CNS lymfoom in DLBCL
- sCD19 (CSV) + FCM
 - Predictor van event-free survival en overall survival in DLBCL en BL

CAT
Laboratoriumdiagnostiek
van leptomeningeale
invasie door
lymfoproliferatief proces

4. Conclusie

- Gouden standaard = conventionele cytologie
- Combinatie met FCM of andere ~ verbeteren van Se
- Nood aan pre-analytische en analytische verbetering:
 - snelle analyse of stabilisatie
 - Keuze juiste immuunfenotyperingspanel

CAT
Laboratoriumdiagnostiek
van leptomeningeale
invasie door
lymfoproliferatief proces

To do/actieplan

- Overleg met clinici (hematologie/neurologie) voor uittesten van stabilisatiemedia bv. Transfix, RPMI
- Aanpassen van interne protocollen voor staalcollectie en bewaring

CAT
Laboratoriumdiagnostiek
van leptomeningeale
invasie door
lymfoproliferatief proces

