

CAT
Critically Appraised Topic**Diagnostische workflow van CMML**

Author: Tomas Gajdos

Supervisor: dr. R. Claeys, dr. V. Peeters, dr. A. Hendrickx

Date: 06/09/2022

CLINICAL BOTTOM LINE

CMML is een belangrijke oorzaak van persisterende monocytose van $\geq 1,0 \times 10^9/L$ en $\geq 10\%$ monocyten bij patiënten ouder dan 70 jaar na uitsluiting van secundaire etiologie. Het is een heterogene maligniteit met aanwezigheid van dysplastische alsook proliferatieve kenmerken dewelke over het hoofd kunnen gezien worden bij morfologische screening van het perifeer bloed uitstrijkje. Om niet elk staal met een monocytose van $\geq 1,0 \times 10^9/L$ en $\geq 10\%$ van het aantal witte bloedcellen morfologisch te moeten beoordelen, is er een nieuwe monocytose workflow geïntroduceerd via de mono-dysplasie score in de EPU van Sysmex. Deze score laat toe om een beter onderscheid te kunnen maken tussen CMML en reactieve monocytose. Hierdoor kan er een reductie van onnodig morfologisch nazicht en uitstrijkjes bekomen worden. Bovendien kan flowcytometrische kwantificatie van het aantal klassieke monocyten (MOI; CD14+, CD16-) ook een meerwaarde betekenen om een verschil te kunnen maken tussen CMML en reactieve monocytose met cut-off $>94\%$ MOI. Verder is er een meerwaarde van morfologisch, cytogenetisch alsook moleculaire diagnostiek beenmergdiagnostiek in de diagnose en risico stratificatie van CMML. Doch dit moet steeds in zijn geheel bekeken worden, vermits mutaties in de desbetreffende genen ook in andere myeloïde neoplasieën kunnen voorkomen en dus minder specifiek zijn. Een goede correlatie tussen morfologie, flowcytometrie, cytogenetica, moleculaire diagnostiek en kliniek is van groot belang om tot een correctie diagnose te komen.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Chronische myelomonocyttaire leukemie (CMML) is een klonale hematopoïetische maligniteit gekenmerkt door de aanwezigheid van persisterende perifere monocytose van $\geq 1 \times 10^9/L$ monocyten en $\geq 10\%$ van de witte bloedcellen (WBC) en dit langer dan drie maanden, met aanwezigheid van dysplastische kenmerken [1,2]. Omwille van deze kenmerken valt CMML binnen de groep van myelodysplastisch (MDS)/ myeloproliferatieve neoplasieën (MPN) in de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) classificatie van 2016 [1]. De WHO-criteria voor BCR-ABL positieve CML, primaire myelofibrose, polycythemia vera en essentiële trombocytose mogen niet voldaan zijn. Er moet ook een afwezigheid zijn van PDGFRA; PDGFRB of FGFR1 en PCMI-JAK2 gen herschikkingen. Het blasten percentage moet kleiner zijn dan 20% in het perifeer bloed alsook in beenmerg. Indien er morfologisch geen argumenten zijn voor dysplasie, kan die diagnose van CMML nog steeds gesteld worden bij aanwezigheid van klonale cytogenetisch of moleculaire afwijkingen [1,3,8,12] (zie figuur 1).

In de WHO-classificatie van 2016 wordt er een onderscheid gemaakt tussen proliferatieve (MPN-CMML) en dysplastische subtypes (MDS-CMML) op basis van het absoluut aantal witte bloedcellen (WBC) met $\geq 13 \times 10^9/L$ voor MPN-CMML en $< 13 \times 10^9/L$ voor MDS-CMML [1]. Deze onderverdeling is gemaakt omwille van klinische, morfologische en moleculaire verschillen tussen beide subtypes: Bij MPN-CMML komen constitutionele

symptomen (asthenie, anorexie, nachtelijk zweten en koorts) meer voor en zijn er eerder mutaties in epigenetische regulator (ASXL1, TET2, DNMT3A) en splicing factor (SRSF2) genen, terwijl bij MDS-CMML eerder de gevolgen van hematopoïetische insufficiëntie (moeheid, infecties, bloedingen en transfusie dependent) op de voorgrond staan en eerder mutaties in genen betrokken bij signaal pathways genen (RAS) aanwezig zijn [5,6]. Verder wordt er een indeling gemaakt aan de hand van het percentage blasten en promonocyten in het perifere bloed (PB) en/of beenmerg (BM): CMML-0; <2% blasten in het PB en <5% blasten in het BM met afwezigheid van Auerstaven. CMML-1; 2-4% blasten in het PB en 5-9% blasten in het BM met afwezigheid van Auerstaven. CMML-2; 5-19% blasten in het PB en 10-19% blasten in het BM of afwezigheid van Auerstaven. Op basis van deze onderverdelingen kan er een betere inschatting gemaakt worden over de prognose en het risico op transformatie naar AML [1]. Patiënten met CMML hebben tijdens het ziekteverloop een inherent verhoogd risico van 15 tot 30% op een maligne transformatie met het ontwikkelen van een acute myeloïde leukemie (AML) [3,4]. De mediane leeftijd waarop CMML gediagnosticeerd wordt, is 65-75 jaar met een mannelijke predominantie van 1.5-3:1. CMML kent een geschatte incidentie van 0.4 gevallen per 100 000 met de hoogste incidentie bij patiënten ouder dan 80 jaar (3.8 gevallen per 100 000) [1,3,7,8].

Bij patiënten met monocytose moeten alle andere mogelijke oorzaken eerst uitgesloten worden alvorens aanvullende diagnostiek uit te voeren voor uitsluiting/bevestiging van een CMML. Hierbij kunnen verschillende niet-hematologische aandoeningen ten grondslag liggen zoals chronische infecties (Tuberculose, Malaria, bacteriële endocarditis en andere), auto-immuun pathologie (reumatoïde artritis, colitis ulcerosa, ziekte van Crohn en andere), beenmerg regeneratie, postsplenectomie (zie tabel 1). Verder kunnen ook andere neoplastische aandoening tegen grondslag liggen bij monocytose (zie tabel 1) [11]. Bij langer bestaande monocytose waarbij secundaire oorzaken zijn uitgesloten, is een uitstrijkje van het perifere bloed aanbevolen om mogelijke neoplasieën uit te sluiten met bovenaan de lijst van differentieel diagnoses een CMML [11].

Morfologische moeilijkheden bij het vermoeden van een CMML kunnen zijn dat de dysplastische kenmerken niet duidelijk aanwezig zijn in elke cellijn. Bovendien is het soms morfologisch moeilijk om een duidelijk onderscheid te maken tussen dysplastische hypogranulaire myeloïde cellen t.o.v. monocyten (zie figuur 2). Verder zijn er in slechts 20% van de gevallen blasten aanwezig en is het morfologisch een moeilijkheid om de aanwezigheid van promonocyten te identificeren in het perifere uitstrijkje [20]. Omwille van deze problemen werd er een mono-dysplasie-score, ontwikkeld a.d.h.v. verschillende parameters (absoluut monocyten aantal, neutrofielen/monocyten ratio en Ne-WX) dewelke uitgebreid gevalideerd en geïmplementeerd werd in de middleware bij de automatisch hematologische celtellers van Sysmex (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) [9,10]. Deze mono-dysplasie-score wordt berekend bij een monocytose van $\geq 1 \times 10^9/L$ monocyten en $\geq 10\%$ van de WBC. Een score $\geq 0,161$ is resultaat suggestief voor een CMML en vereist verdere uitwerking [9,10]. Het in gebruik nemen van deze score zorgt op die manier voor een optimalisatie in de workflow van monocytose en een vermindering van het aantal onnodige uitstrijkjes.

Bij een vermoeden van CMML is bovendien flowcytometrische analyse van perifere bloed nuttig om een extra argument te hebben voor of tegen de diagnose van een CMML. Monocyten in het perifere bloed bevatten 3 subsets gedefinieerd door het voorkomen van de membraanmarkers CD14 en CD16: klassieke monocyten (CD14+CD16), intermediaire monocyten (CD14+CD16zw+) en niet-klassieke monocyten (CD14-CD16+) [3,12-17]. Een stijging in de klassieke monocyten fractie boven 94.0% van de totale monocytenpopulatie werd in 2015

door Selimoglu-Buet et al. beschreven als grens om CMML te onderscheiden van reactieve monocytose [16]. Deze cut-off demonstreert een zeer beperkte inter-laboratoria variabiliteit van het percentage klassieke monocyten en is dit onafhankelijk van mutaties, subtype, of van dysplasie versus proliferatieve eigenschappen [16,18].

Bij de aanwezigheid van een morfologisch en immuunfenotypisch vermoeden van CMML, wordt er overgegaan tot beenmergdiagnostiek waarbij cytologisch, cytogenetisch en moleculair onderzoek uitgevoerd wordt. De aanwezigheid van cytogenetische afwijkingen wordt in 30% van de CMML patiënten waargenomen. Deze zijn voornamelijk trisomie 8, -Y, monosomie 7, deletie 7q, trisomie 21 en complexe karyotypes [1,12,13,19]. Somatische mutaties worden via next generation sequencing daarentegen in meer dan 90% van de gevallen waargenomen. De meest gemuteerde genen zijn TET2 (60%), SRSF2 (50%), ASXL1 (40%) en genen van de RAS pathway (30%). De aanwezigheid van SRSF2 en TET2 mutaties is suggestief voor de diagnose van CMML [1,12,13,19].

Er zijn dus verschillende onderzoeken nodig om tot de diagnose van CMML te komen. In deze CAT werden de mono-dysplasie-score, morfologische dysplasie en flowcytometrie van dichtbij bekeken en nagegaan wat de meerwaarde ervan betekent voor de diagnostische workflow van CMML.

QUESTION(S)

- 1) Wat is de mono-dysplasie-score en welke overeenkomsten zijn er met morfologische kenmerken van dysplasie bij neutrofielen?
- 2) Welke meerwaarde heeft het nieuwe CMML-panel bij het vermoeden van CMML?
- 3) Welke workflow kan er gevolgd worden bij een vermoeden van CMML?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: "Chronic myelomonocytic leukemia"; "Chronic myelomonocytic leukemia + Flow cytometry"; "Chronic myelomonocytic leukemia + diagnosis"; "Chronic myelomonocytic leukemia + score";
- 2) PubMed Clinical Queries: CMML diagnosis sensitivity, CMML flow cytometry sensitivity
- 3) Pubmed (Medline; from 1966): "Chronic myelomonocytic leukemia"; "CMML"; "CMML + flow cytometry"; "CMML + prognostic factors"; "CMML + mutations"; "Monodysplasia score"
- 4) UpToDate Online: "Chronic myelomonocytic leukemia: Management and prognosis"

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

a. Guidelines and Recommendations

19. Valent P, Orazi A, Savona MR, Patnaik MM, Onida F, Van De Loosdrecht AA, et al. Proposed diagnostic criteria for classical chronic myelomonocytic leukemia (CMML), CMML variants and pre-CMML conditions. *Haematologica*. 2019;104(10):1935–49.
21. http://www.islh.org/web/consensus_rules.php
22. Geneviève, F., Mercier-Bataille, D., Wagner-Ballon, O., Trimoreau, F., Fenneteau, O., Schillinger, F., Leymarie, V., Girard, S., Settegrana, C., Daliphard, S., Soenen-Cornu, V., Cividin, M., Châtelain, B., Troussard, X., & Bardet, V. (2014). Smear microscopy revision: propositions by the GFHC.

b. Reviews

2. Renneville, A., Patnaik, M. M., Chan, O., Padron, E., & Solary, E. (2021). Increasing recognition and emerging therapies argue for dedicated clinical trials in chronic myelomonocytic leukemia. In *Leukemia* (Vol. 35, Issue 10, pp. 2739–2751). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01330-1>
3. Patnaik, M. M., & Tefferi, A. (2020). Chronic Myelomonocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and management. *American Journal of Hematology*, 95(1), 97–115. <https://doi.org/10.1002/ajh.25684>.
7. Hunter, A. M., Zhang, L., & Padron, E. (2018). Current Management and Recent Advances in the Treatment of Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Current Treatment Options in Oncology*, 19(12). <https://doi.org/10.1007/s11864-018-0581-6>
8. Arber, D. A., & Orazi, A. (2019). Update on the pathologic diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia. In *Modern Pathology* (Vol. 32, Issue 6, pp. 732–740). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0215-y>
11. Lynch DT, Hall J, Foucar K. How I investigate monocytosis. *Int J Lab Hematol*. 2018;40(2):107–14.
12. Sangiorgio VFI, Arber DA, Orazi A. How I investigate chronic myelomonocytic leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2020;42(2):101–8.
13. Itzykson R, Fenaux P, Bowen D, Cross NCP, Cortes J, De Witte T, et al. Diagnosis and Treatment of Chronic Myelomonocytic Leukemias in Adults. *HemaSphere*. 2018;2(6):e150.
24. Patnaik MM, Lasho TL, Vijayvargiya P, Finke CM, Hanson CA, Ketterling RP, et al. Prognostic interaction between ASXL1 and TET2 mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood Cancer J* [Internet]. 2016;6(1):e385-5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bcj.2015.113>

c. Original Articles

4. Padron, E., Garcia-Manero, G., Patnaik, M. M., Itzykson, R., Lasho, T., Nazha, A., Rampal, R. K., Sanchez, M. E., Jabbour, E., al Ali, N. H., Thompson, Z., Colla, S., Fenaux, P., Kantarjian, H. M., Killick, S., Sekeres, M. A., List, A. F., Onida, F., Komrokji, R. S., Solary, E. (2015). An international data set for CMML validates prognostic scoring systems and demonstrates a need for novel prognostication strategies. *Blood Cancer Journal*, 5(7). <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.53>
5. Cervera, N., Itzykson, R., Coppin, E., Prebet, T., Murati, A., Legall, S., Vey, N., Solary, E., Birnbaum, D., & Gelsi-Boyer, V. (2014). Gene mutations differently impact the prognosis of the myelodysplastic and myeloproliferative classes of chronic myelomonocytic leukemia. *American Journal of Hematology*, 89(6), 604–609. <https://doi.org/10.1002/ajh.23702>
6. Ricci, C., Fermo, E., Corti, S., Molteni, M., Faricciotti, A., Cortelezzi, A., Deliliers, G. L., Beran, M., & Onida, F. (2010). RAS mutations contribute to evolution of chronic myelomonocytic leukemia to the proliferative variant. *Clinical Cancer Research*, 16(8), 2246–2256. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2112>
9. Schillinger F, Sourdeau E, Boubaya M, Baseggio L, Clauser S, Cornet E, et al. A new approach for diagnosing chronic myelomonocytic leukemia using structural parameters of Sysmex XNTM analyzers in routine laboratory practice. *Scand J Clin Lab Invest* [Internet]. 2018 Apr 3;78(3):159–64. Available from: <https://doi.org/10.1080/00365513.2018.1423702>
10. Kocaturk E, Kusu Kiraz Z, Uskudar Teke H, Demir SS, Alatas IO. A new approach for diagnosing hematological malignancies using monocytosis workflow optimization and abnormal lymphocyte/blast flag of Sysmex XN series of blood count analyzers. *Int J Lab Hematol*. 2020;42(6):744–9.
14. Zhu J, Sourdeau E, Aubert H, Clauser S, Maillon A, Capron C, et al. A hierarchical approach in the diagnostic workflow of chronic myelomonocytic leukemia: Pivotal role of the “Mono-dysplasia-score” combined with flow cytometric quantification of monocyte subsets. *Int J Lab Hematol*. 2019;41(6):782–90.

15. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2015;125(23):3618–26.
16. Hudson CA, Burack WR, Leary PC, Bennett JM. Clinical Utility of Classical and Nonclassical Monocyte Percentage in the Diagnosis of Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2018;150(4):293–302.
17. Tarfi S, Harivel V, Dumezy F, Guy J, Roussel M, Mimoun A, et al. Multicenter validation of the flow measurement of classical monocyte fraction for chronic myelomonocytic leukemia diagnosis. *Blood Cancer J*. 2018;8(11):0–9.

d. *Reference Works, Handbooks and Databases*

- 1.razi A, Bennett JM, Germing U, et al., et al. Chronic myelomonocytic leukaemia. In: Swerdlow SH, ed. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th ed.)*. Lyon, France: IARC; 2017:82-86.

e. *Posters, “grey literature”, presentations*

20. Monocytosis workflow management – a smart solution. Sysmex. 2021.
23. <https://webapps.riziv-inami.fgov.be/Nomen/nl/search>
25. N. Boeckx, Monocyten, CMML en ASXLI, Laboratoriumgeneeskunde, UZ Leuven, 2016

APPRAISAL

1. Wat is de monodysplasie-score en welke overeenkomsten zijn er met morfologische kenmerken van dysplasie bij de neutrofielen?

De aanwezigheid van $\geq 1 \times 10^9/L$ monocyt en $\geq 10\%$ van de WBC zou, indien de WHO-aanbevelingen gevolgd worden (het nakijken van het perifeer bloed uitstrijkje op morfologische kenmerken van dysplasie of blasten excès bij aanwezigheid van WHO-criteria voor CMML), leiden tot een grote toename in onnuttige uitstrijkjes. In de praktijk zou dit neerkomen op ongeveer 6 à 7% van de stalen waarbij een microscopisch nazicht nodig is [14]. Bij het volgen van de aanbevelingen van de International Society for Laboratory Hematology (ISLH) en deze van Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire (GFHC) is er microscopisch nazicht nodig bij $\geq 1,5 \times 10^9/L$ monocyt bij een eerste hematologische onderzoek met WBC telling en differentiatie of bij persisterende monocytose voor meer dan 30 dagen [21,22]. Hierdoor werd er een reductie bekomen van het aantal onnodige uitstrijkjes tot 1,2% [20]. In een multicentrische studie van Schillinger et al. werd via resultaten van de Sysmex analyzers van patiënten met reactieve monocytose en CMML een score berekenend voor microscopisch nazicht bij stalen met monocytose. Deze score (zie tabel 2) werd de "mono-dysplasie-score" genoemd en werd als positief beschouwd bij een drempel van 0,160. De mono-dysplasie-score is gebaseerd op drie parameters (neutrofielen/monocyt ratio (Ne/Mo), neutrofielen dispersie parameter (Ne-WX) en het absoluut aantal monocyt (Mo)) [9]. De Ne-WX parameter, bekomen via het WDF-kanaal, is een sensitieve parameter voor het detecteren van minimale hypogranulatie van neutrofielen en is gestegen bij aanwezigheid van hypogranulatie hetgeen een kenmerk is van dysplasie en dus ook een van de WHO-criteria voor CMML. De Ne/Mo ratio zorgt voor een extra argument om het onderscheid te kunnen maken tussen reactieve en maligne monocytose met een daling van de ratio bij maligne monocytose [20]. De parameters die in de mono-dysplasie-score vervat zitten zijn dus, in tegenstelling tot morfologie, gestandaardiseerd, operator onafhankelijk en onmiddellijk berekend. Bij de validatie van deze score in een cohort van 1809 stalen werd er een sensitiviteit van 92,3% en een specificiteit van 93,6% bekomen. Door de hoge negatieve predictieve waarde (NPV) van 99,9% van de mono-dysplasie-score kan het microscopisch nazicht zelfs tot 0,5% dalen zonder verlies aan sensitiviteit [9,14].

De morfologische aanwezigheid van dysplasie kan soms moeilijk te beoordelen zijn en is operator afhankelijk. Om de overeenkomsten te beoordelen tussen morfologie en de mono-dysplasie-score werd gedurende een half jaar een databank bijgehouden van alle stalen (n=202) met de volgende vlaggen in de EPU van onze Sysmex toestellen:

1. "Positieve mono-dysplasie score": Volwassen ($>15j$) + Monocytose ($\geq 1.0 \times 10^3/\mu L$ monocyt en $\geq 10\%$ van de WBC) + mono-dysplasie score $>0,160$.
2. "Twijfelachtige monocytose": Monocytose ($\geq 1.0 \times 10^3/\mu L$ monocyt en $\geq 10\%$ van de WBC) + mono-dysplasie score $>0,160$ + "WBC abn scattergram"-vlag.
3. "Extreme monocytose": Volwassen ($>15j$) + Monocytose ($\geq 3.0 \times 10^3/\mu L$ monocyt)

Bij stalen met deze vlaggen wordt er standaard een uitstrijkje gemaakt via het automatisch uitstrijk- en kleuringssysteem (SP-50 module) van de automatische hematologische celtellers van Sysmex XN-9100 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) en vervolgens bekeken door de laboranten via de Cellavision DM9600 software (CellaVision AB, Lund, Sweden). Hierna werd er morfologisch nazicht gedaan naar de aanwezigheid van dysgranulopoïese: hypogranulatie, kernafwijkingen, hypo- en hypersegmentatie in afwezigheid van inflammatie.

Bij een totaal van 202 patiënten is de "Positieve mono-dysplasie score"-vlag 124 keren afgegaan (61.4%), de "Twijfelachtige monocytose"-vlag 64 keren (31.7%) en de "Extreme monocytose"-vlag 14 keren (6.9%). Bij de eerste

twee vlaggen is er dus een positieve mono-dysplasie score berekend, doch zijn er in slechts 29 van 124 uitstrijkjes (23.4%) bij de “*Positieve mono-dysplasie score*”-vlag en 14 van de 64 uitstrijkjes (21.9%) bij de “*Twijfelachtige monocytose*”-vlag dysplastische kenmerken van de neutrofielen waar te nemen (zie tabel 3). Intuïtief zou er bij een positieve mono-dysplasie score een aanwezigheid moeten zijn van gedegranuleerde neutrofielen, vermits dit vervat zit in de score. Dit bleek echter slechts in 29 gevallen (15.4%) morfologisch aanwezig te zijn. Een mogelijke verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat er via de hematologische cel tellers veel meer cellen geanalyseerd worden en dat de aanwezigheid van hypogranulatie operator afhankelijk is en soms moeilijk te beoordelen valt.

Bij retrospectief morfologisch nazicht van 18 gediagnosticeerde CMML patiënten weerhield het perifeer bloeditstrijkje slecht in 7 patiënten (38.9%) tekens van dysplasie met name hypogranulatie van de neutrofielen (zie tabel 4). Bij al deze 18 CMML patiënten was er een positieve mono-dysplasie score aanwezig. Het is dus belangrijk om niet louter morfologisch verdere vervolgonderzoeken aan te vragen, maar ook te kijken naar de mono-dysplasie score met bijhorende WDF-scattergram.

2. Welke meerwaarde heeft het nieuwe CMML-panel bij het vermoeden van CMML?

Monocyten in het perifeer bloed bestaan immunofenotypisch uit drie subsets: klassieke monocyten (MO1; CD14+CD16), intermediaire monocyten (MO2; CD14+CD16^{zw+}) en niet-klassieke monocyten (MO3; CD14-CD16+) [3,12-17]. Een gestegen MO1 fractie tot groter dan 94.0% van de totale monocytenpopulatie werd in 2015 door Selimoglu-Buet et al. voorgelegd als indicatie om CMML te onderscheiden van reactieve monocytose [16]. Dit werd bevestigd in een nationale Franse studie door Tarfi et al. hierin werd gedemonstreerd dat er een zeer beperkte inter-laboratoria variabiliteit van de MO1 fractie aanwezig is en dit onafhankelijk van mutaties, subtype, of van dysplasie versus proliferatieve eigenschappen is [17]. De sensitiviteit en specificiteit van dit panel werd in de twee studies uitgebreid gevalideerd met een bekomen waarde van respectievelijk 91.9% en 94.1% door Selimoglu-Buet et al. en 93.6% en 89.7% door Tarfi et al. [16,17].

In het Jessa ziekenhuis werd er gebruik gemaakt van een CMML-panel met 8 monoklonale antistoffen (CD2, CD14, CD15, CD33, CD16, CD24, CD45, CD56) (zie tabel 4) op de 8-kleuren flowcytometer (FACSCanto (II), BD-Biosciences). Eind 2021 werden twee nieuwe 12-kleuren flowcytometers aangekocht (FACSLytic, BD-Biosciences). Alvorens te starten met de validatie van het CMML-panel werd er gekeken of er bij het gebruik van minder monoklonale antistoffen een even goede performantie behaald kon worden. Er zou gebruik worden gemaakt van een panel van 6 monoklonale antistoffen (CD2, CD14, CD16, CD24, CD45, CD56) (zie tabel 5) dewelke gebruikt werd in de studie van Selimoglu-Buet et al. [16]. Hierbij werd de volgende gatingstrategie toegepast (zie figuur 4):

1. Algemene gating:

- a. FSC-A/Time (All events): Storingen in de analyse opsporen (verstoppingen, leeglopen van de tube, luchtbellen).
- b. FSC-A/FSC-H (Time): Opzuiveren singlets.
- c. SSC/FSC (Singlets): Debris uit sluiten.
- d. CD45/SCC (Cellen): Gaten van de WBC en monocyten.

2. Opzuiveren van de monocytenpopulatie:

- a. SSC/CD24 (CD45+): Opzuiveren van de monocytegate door weglaten van de neutrofielen en B-lymfocyten.
- b. SSC/CD16 (CD45+): Opzuiveren van de monocytegate door weglaten van de rijpe granulocyten.
- c. SSC/CD56 (CD45+): Opzuiveren van de monocytegate door weglaten van de NK-cellen.
- d. SSC/CD2 (CD45+): Opzuiveren van de monocytegate door weglaten van de T- en NK-lymfocyten.
- e. CD16/CD14 (Boolean: MONO Gate): Opzuiveren van de monocytegate door weglaten van dubbel negatieve cellen.

3. Typeren van de monocyten subsets:

- a. CD16/CD14 (Monocyten): hier kunnen 3 populaties onderscheiden worden:
 - i. Klassieke monocyten CD14+CD16 gate MO1
 - ii. Intermediaire monocyten CD14+CD16+ gate MO2
 - iii. Niet-klassieke monocyten CD14-CD16 gate MO3

Het onderscheid van de 3 monocytensubpopulaties was niet altijd éénduidig uit te voeren op de dot plot. Dit kon verbeterd worden door een bijkomende contour plot toe te voegen: CD16/CD14 (Monocyten) waarbij de gates van de beide plots gekoppeld blijven.

Er werd vervolgens een correlatie gemaakt tussen het MOI percentage van het oude panel en het nieuwe panel door FCS-files van 20 geanalyseerde CMML stalen en 15 reactionele stalen in te laden in het verkorte panel. Het MOI percentage werd vergeleken door middel van een Passing-Bablok regressie. Erbij werd er een goede overeenstemming gevonden tussen de resultaten met een correlatiecoëfficiënt van 0.99 (zie tabel 7 en figuur 5). Bovendien werd de sensitiviteit, specificiteit, positieve en negatieve predictieve waarde van het nieuwe panel geëvalueerd door middel van 56 stalen (8 normale, 21 reactionele en 26 CMML stalen) (zie tabel 8). Binnen de 26 CMML stalen waren retrospectief 3 vals positieve resultaten (MOI >94%) met een einddiagnose van essentiële trombocytose, myelodysplastisch syndroom met ringsideroblasten en een staal met negatieve NGS. Binnen de normale stalen was er 1 staal met een einddiagnose van een monoklonale B-lymfocytose type CLL + CMML met MOI <94%. De bekomen sensitiviteit en specificiteit waren respectievelijk 95,7% en 90,9% hetgeen ongeveer overeenkomt met de literatuur [16,17]. Verder heeft het panel een hoge negatieve predictieve waarde van 96,8% hetgeen impliceert dat bij een negatief resultaat op flowcytometrie (MOI <94%) de diagnose van CMML minder waarschijnlijk wordt.

De prijsvergelijking tussen beide panels werden berekend aan de hand van het gebruikte volume en het totaal volume van het reagens. Een uitgebreid overzicht is terug te vinden in tabel 9. Hierbij is er een totaalkost van 20,84 euro per test aan monoklonale antistoffen bij het oude panel en bij het nieuwe panel is dit gereduceerd tot 10,35 euro per test. Er is dus een duidelijke kostenreductie bij het gebruik van het nieuwe panel zonder verlies aan performantie.

Samengevat heeft het nieuwe panel een goede performantie met een hoge correlatie met het oude panel qua resultaten. Bovendien zijn de performantie karakteristieken in overeenstemming met de literatuur en is er een aanzienlijke kostenreductie van 10,35 euro. Alvorens dit nieuwe panel te implementeren zal het eerst uitgebreid gevalideerd moeten worden volgens de richtlijnen van het CSLI H62-document.

3. Welke workflow kan er gevolgd worden bij een vermoeden van CMML?

Alvorens de gehele diagnostische workflow uit te werken bij het vermoeden van CMML, moeten eerst alle andere mogelijke oorzaken van monocytose uitgesloten worden (zie tabel 1). Eenmaal secundaire en reactieve oorzaken uitgesloten zijn, kan het vlaggen systeem van de EPU van Sysmex een meerwaarde bieden in de differentiële diagnostiek en verdere uitwerking (zie afbeelding 6). Bij een monocytose van $\geq 1.0 \times 10^9/L$ en $\geq 10\%$ monocyten zal de mono-dysplasie score in de EPU berekend worden en afhankelijk van het al dan niet positief zijn, zal er enerzijds gekeken worden naar morfologische kenmerken van dysplasie in het uitstrijkje en afwijkingen bij de monocyten. Voornamelijk zal zich dit manifesteren via hypo-/agranulatie of kernaafwijkingen van de neutrofielen. Het eerstgenoemde is ook af te leiden uit het WDF-scattergram door een uitgestreken neutrofielenwolk naar links toe op de x-as. Dit kan verklaard worden door het feit dat neutrofielen met hypo-/agranulatie een lagere korreling hebben hetgeen zich weerspiegelt in een lagere positie op de side scatter (SSC) in de X-as. Het WDF-scattergram kan dus in deze gevallen als een extra hulpmiddel dienen om het onderscheid te maken tussen hypo-/agranulatie en reactieve neutrofielen (zie afbeelding 7). De volgende stap in de workflow is om morfologisch het uitstrijkje van het perifeer bloed te gaan bekijken. Hierbij is het belangrijk om de volgende zaken in acht te nemen:

- De aanwezigheid van monocytose moet morfologisch bevestigd worden, vermits automatisch hematologische celltellers soms abnormale lymfocyten verkeerd kunnen classificeren als hairy cellen of Sézary cellen [11].
- Morfologie van de monocyten: Aanwezigheid van aberrante monocyten, promonocyten of monoblasten kan een argument zijn voor CMML of in aanwezigheid van blasten voor AML met monocytair differentiatie.
- Morfologie van de neutrofielen: Toxische korreling, vacuolisatie samen met hypersegmentatie kan een argument zijn voor een reactieve etiologie. Daarentegen is de aanwezigheid van dysplasie met name: hypo-/agranulatie, aberrante kernsegmentatie een argument voor MDS kenmerk.
- Morfologie van de bloedplaatjes: Reuzevormen van bloedplaatjes en hypogranulariteit kan suggestief zijn voor een hematologische neoplasie.

Bij aanwezigheid van een positieve mono-dysplasie score en/of morfologische kenmerken van dysplasie in de neutrofielen en/of monocyten, is het aanbevolen om op het perifeer bloed flowcytometrische analyse uit te voeren met het CMML-panel. Hier is het hoofddoel om na te gaan wat het percentuele aandeel is van de klassieke monocyten subpopulatie en of er aberrante expressie aanwezig is op de monocyten (zoals bijvoorbeeld CD56). Het voorkomen van $>94\%$ MOI is een goede indicator om CMML te onderscheiden van reactieve monocytose [16]. Bovendien kan onder andere de aberrante expressie van CD56 op de monocytenpopulatie ook een extra argument zijn voor dysplasie. Bij een MOI $<94\%$ wordt er verder gezocht naar een andere mogelijke etiologie (therapie gerelateerd, reactioneel en andere (hematologische) maligniteiten).

Eenmaal er een argument is voor CMML, wordt er overgegaan op beenmergonderzoek d.m.v. beenmergpunctie en botboorbiopsie. In het beenmerg zal er ook gekeken worden naar de identificatie van aberrante monocyten, promonocyten of monoblasten. De voorlaatste genoemde cellen worden volgens de WHO richtlijnen als blasten equivalent beschouwd en worden bij de blasten geteld [1]. Verder zal er wordt er gekeken naar morfologische argumenten van dysplasie in een of meerdere mergreeksen. De verschillende vormen van dysplasie bij, onder anderen CMML, staan opgesomd in figuur 6 onderaan. Verder mag het blasten percentage niet meer dan 19% zijn, vermits er dan sprake is van een acute leukemie hetgeen een andere diagnostische workflow vergt en behandeling.

De volgende stap in de diagnostische workflow zijn cytogenetisch en moleculair onderzoek van het beenmerg. Clonale cytogenetische afwijkingen worden in 30% van de gevallen gedetecteerd bij CMML patiënten. Deze zijn voornamelijk trisomie 8, -Y, monosomie 7, deletie 7q, trisomie 21 en complexe karyotypes [1,12,13,19]. Doch zijn deze cytogenetische afwijkingen niet specifiek voor CMML en kunnen ze ook bij andere myeloïde neoplasieën voorkomen [1,11,12]. Somatische mutaties worden daarentegen via next generation sequencing in meer dan 90% van de gevallen waargenomen. De meest gemuteerde genen zijn TET2 (60%), SRSF2 (50%), ASXL1 (40%) en genen van de RAS pathway (30%). De aanwezigheid van SRSF2 en TET2 mutaties is suggestief voor de diagnose van CMML [1,12,13,19]. Binnen de opgesomde gemuteerde genen zijn de aanwezigheid van ASXL1 mutaties belangrijk omwille van het feit dat deze mutaties gecorreleerd zijn met een slechte prognose [1,12,24,25]. NPM1 mutaties komen in ongeveer 5% van de CMML gevallen voor. Patiënten met deze mutatie hebben een hogere kans in progressie richting AML en slechtere prognose [1,12]. Net zoals bij de cytogenetische afwijkingen, zijn al deze mutaties niet specifiek voor CMML en kunnen ook bij andere myeloïde neoplasieën gevonden worden. Het is dus van belang om de resultaten van het cytogenetisch en moleculair onderzoek steeds te kaderen met de bevindingen die gevonden zijn via flowcytometrie, morfologie en kliniek [12]. Tenslotte is bij een suggestief beeld voor CMML het blasten percentage van belang bij de verdere onderverdeling en prognose (zie figuur 6).

COMMENTS

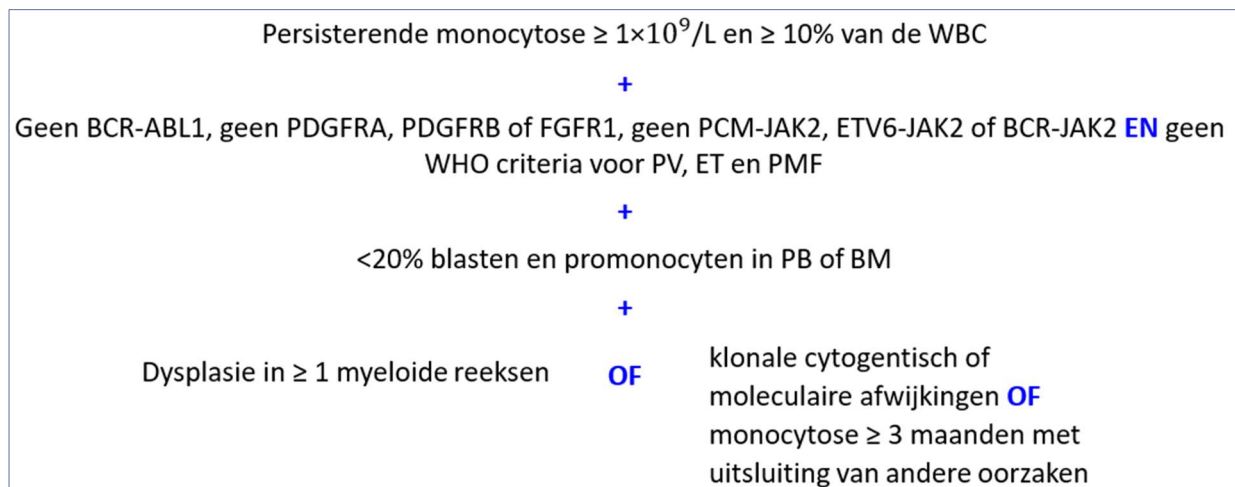
TO DO/ACTIONS

- 1) Gebruik van de workflow uitleggen aan de laboranten cytologie en herevaluatie.
- 2) De laboranten van werkpost immuunfenotypering bijscholen over het gebruik van het verkorte CMML-panel (monoklonale antistoffen, gating strategie en pitfalls).
- 3) Validatie van het nieuwe CMML-panel volgens het CLSI H62-document.

ATTACHMENTS**Tabel I:****TABLE 1** Example causes of peripheral monocytosis

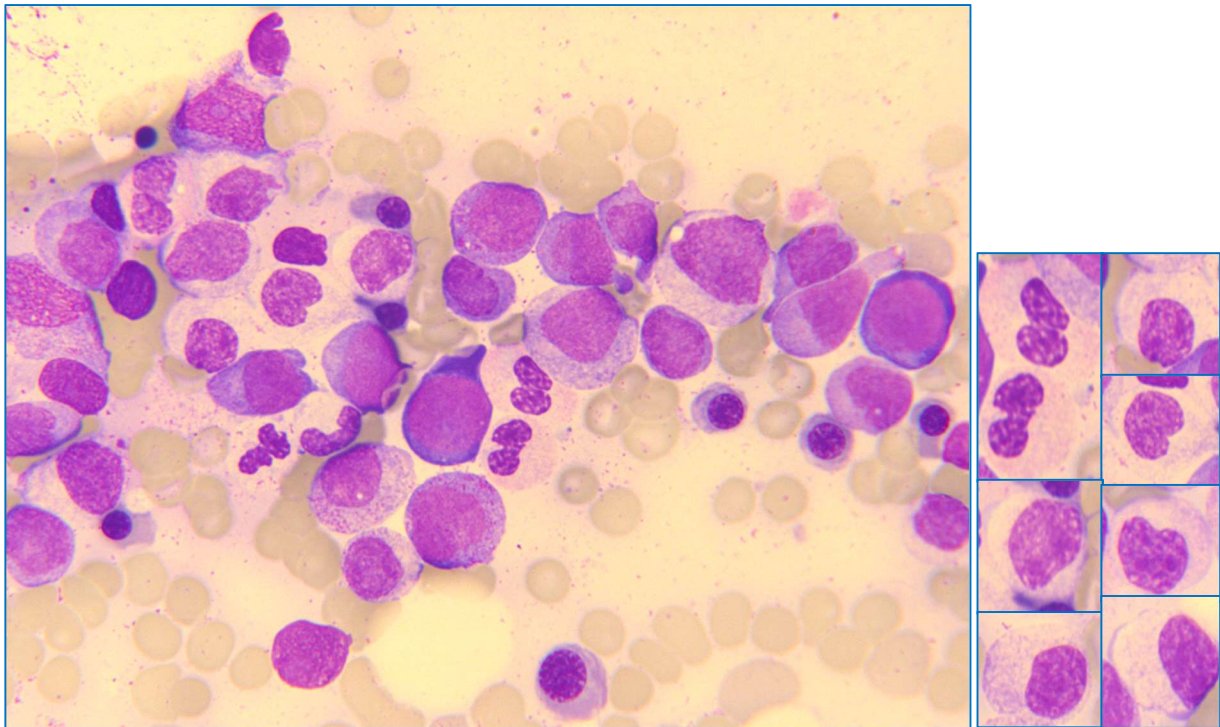
Neutropenia and bone marrow recovery ²¹
Chronic infections (eg, viral, tuberculosis, malaria, subacute bacterial endocarditis, and congenital syphilis) ²¹⁻²⁴
Immune/inflammatory disorders (eg, collagen vascular diseases, inflammatory bowel disease, sarcoidosis, and immune thrombocytopenia) ^{21,25,26}
Myocardial infarction ²⁷
Sickle cell disease and other hemolytic anemias ^{28,29}
Chronic stress ³⁰
Postsplenectomy ³¹
Iatrogenic causes (eg, cytokine therapy, steroids, ziprasidone, and radiation therapy) ^{21,32-35}
Cutaneous myeloid dendritic cell dyscrasia ³⁶
Myeloid malignancies (eg, MPN, MDS, MDS/MPN, and AML) ^{21,37}
Lymphoid and plasma cell malignancies (eg, B cell and T cell types) ^{21,38-40}
Solid tumors (eg, carcinoma) ⁴¹

Overgenomen uit Lynch DT, Hall J, Foucar K. How I investigate monocytosis. *Int J Lab Hematol.* 2018;40(2):107–14.

Figuur 1:

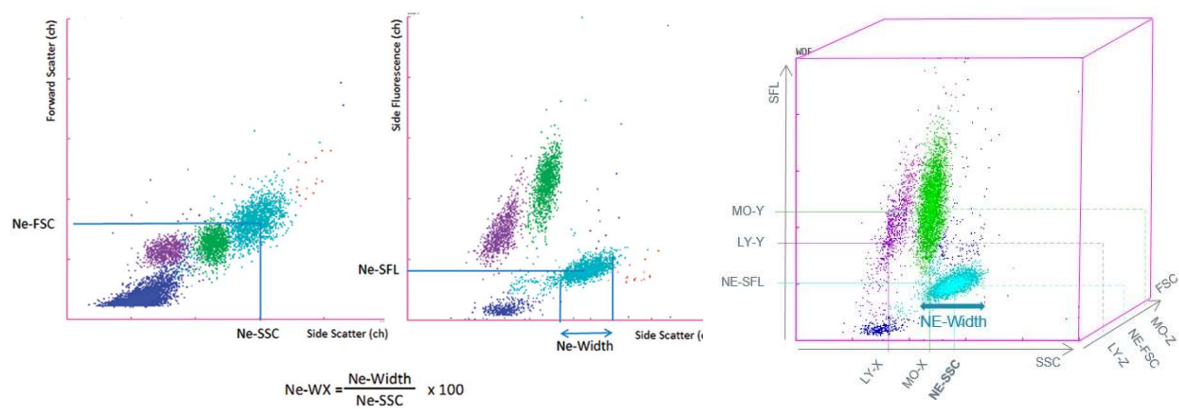
2016 WHO criteria voor diagnose van CMML

Figuur 2:



Beenmergonderzoek van een patiënt met diagnose CMML. Morfologisch moeilijk onderscheid te maken tussen gedegranuleerde neutrofielen en monocytën.

Figuur 3:



Driedimensionale weergaven van het WDF-scattergram met de dispersie van de neutrofielen (Ne-width parameter). Figuur overgenomen van <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/scientific-calendar-2019/march.html>

Tabel 2:

Mono-dysplasie score =	$\frac{1}{1 + e^{-(11,623 + 0,026 * Ne - WX - 1,385 * \frac{Ne}{Mo} + 2,714 * AbsMono)}}$
------------------------	---

Mono-dysplasie score bepaald door Schillinger et al. [9]

Tabel 3:

Totaal = 202	Monodysplasie-score positief (n=124)		Twijfelachtige monocytose (n=64)		Extreme monocytose (n=14)	
	Aantal uitstrijkjes	Percentage	Aantal uitstrijkjes	Percentage	Aantal uitstrijkjes	Percentage
Toxische korreling	24	19,4	26	40,6	4	28,6
Hypersegmentatie neutrofielen	8	6,5	0	0,0	1	7,1
Döhle bodies	0	0,0	0	0,0	1	7,1
Degranulatie neutrofielen	21	16,9	8	12,5	1	7,1
Neutrofielen kernafwijking	16	12,9	11	17,2	2	14,3
Vacuolisatie neutrofielen	2	1,6	1	1,6	0	0,0
Jonge monocyten	1	0,8	2	3,1	0	0,0
Dysplastische kenmerken	29	23,4	14	21,9	2	14,3
Diagnose CMML	14	11,3	4	6,3	0	0,0

Overzichtstabel morfologie van de dysplasie van stalen met monocytose vlaggen.

Tabel 4:

	aantal uitstrijkjes	percentage
Dysplasie + CMML	7	38,9
Afwezigheid dysplasie + CMML	11	61,1
Totaal	18	100

Overzichtstabel correlatie morfologie dysplasie en diagnose CMML.

Tabel 5:

Oud	HV450	HV500	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
CMML	CD14 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD16 10 µL	CD56 10 µL	CD2 10 µL	CD15 1 µL	CD33 2.5 µL	CD24 1 µL

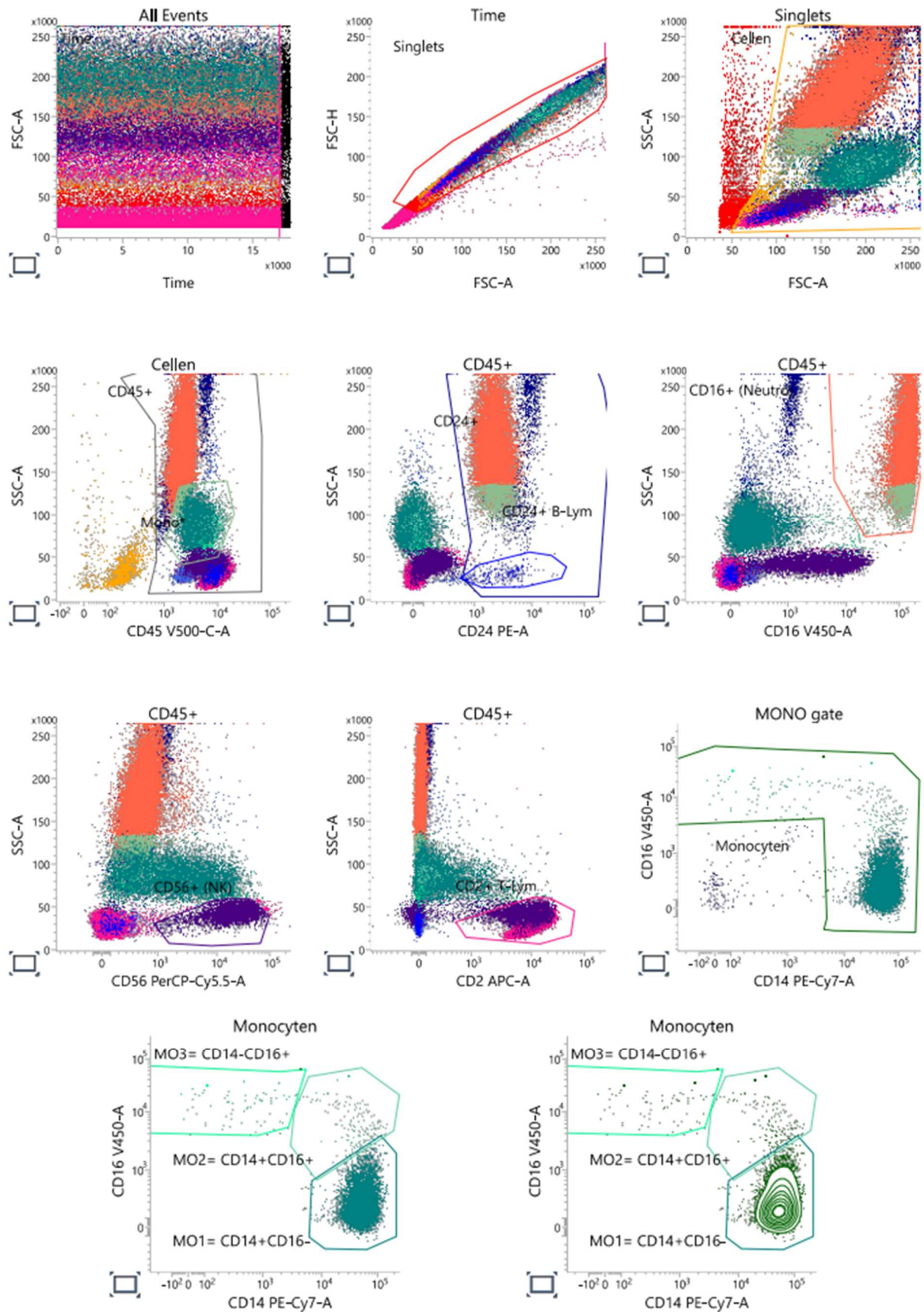
Overzichtstabel van de gebruikte monoklonale en het volume bij het oude panel.

Tabel 6:

Nieuw	PE	PERCP Cy5.5	PE Cy7	APC	V450	V500-C
CMML	CD24 5 µL	CD56 2.5 µL	CD14 2.5 µL	CD2 2.5 µL	CD16 2.5 µL	CD45 2.5 µL

Overzichtstabel van de gebruikte monoklonale en het volume bij het nieuwe panel.

Figuur 4:



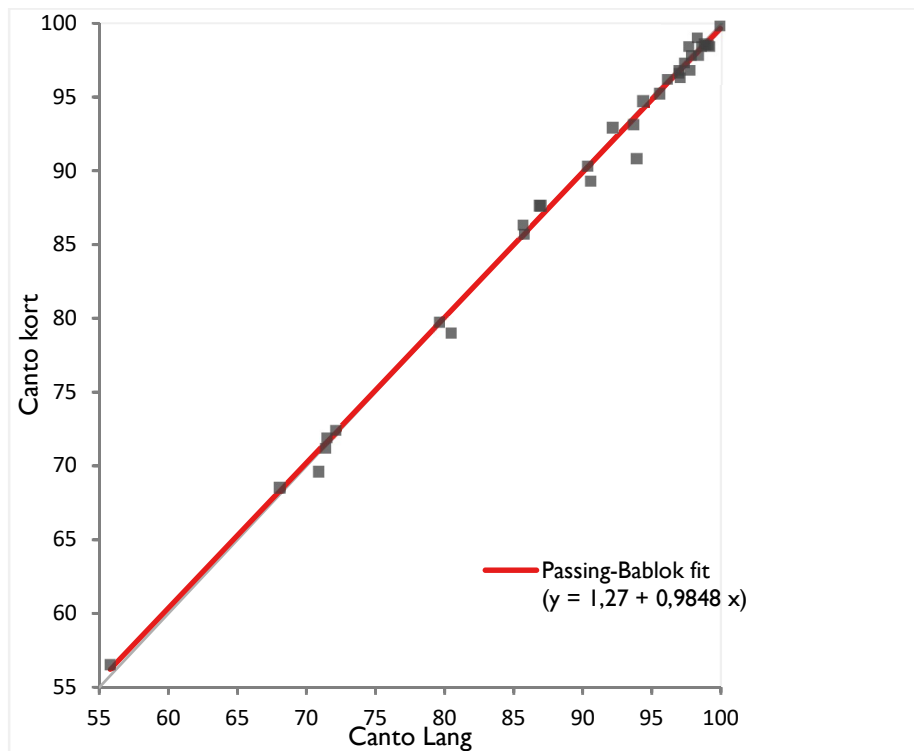
Gating strategie van het CMML panel bij een CMML patiënt op de Lyrisc flowcytometrie toestel .

Tabel 7:

Correlatie	Passing Bablok	Gem% verschil
0,99	$Y = 1,27 + 0,9848X$	-0,23

Passing-bablok regressie tussen het oude en het nieuwe CMML-panel.

Figuur 5:



Passing-bablok regressie tussen het oude en het nieuwe CMML-panel.

Tabel 8:

Canto	Bevestigde diagnose NGS/APO/Andere		Totaal
	Positief	Negatief	
MOI (CD14+,CD16-) $\geq$ 94%	22	3	25
MOI (CD14+,CD16-) < 94%	1	30	31
Totaal	23	33	56

Diagnostische specificiteit	90,9
Diagnostische sensitiviteit	95,7
Positieve predictieve waarde	88,0
Negatieve predictieve waarde	96,8

Performantie karakteristieken van het nieuwe CMML-panel op de FACSCanto (II), BD-Biosciences.

1 vals negatief staal: negatief resultaat op flowcytometrie, doch NGS suggestief voor CMML + MBLCLL.

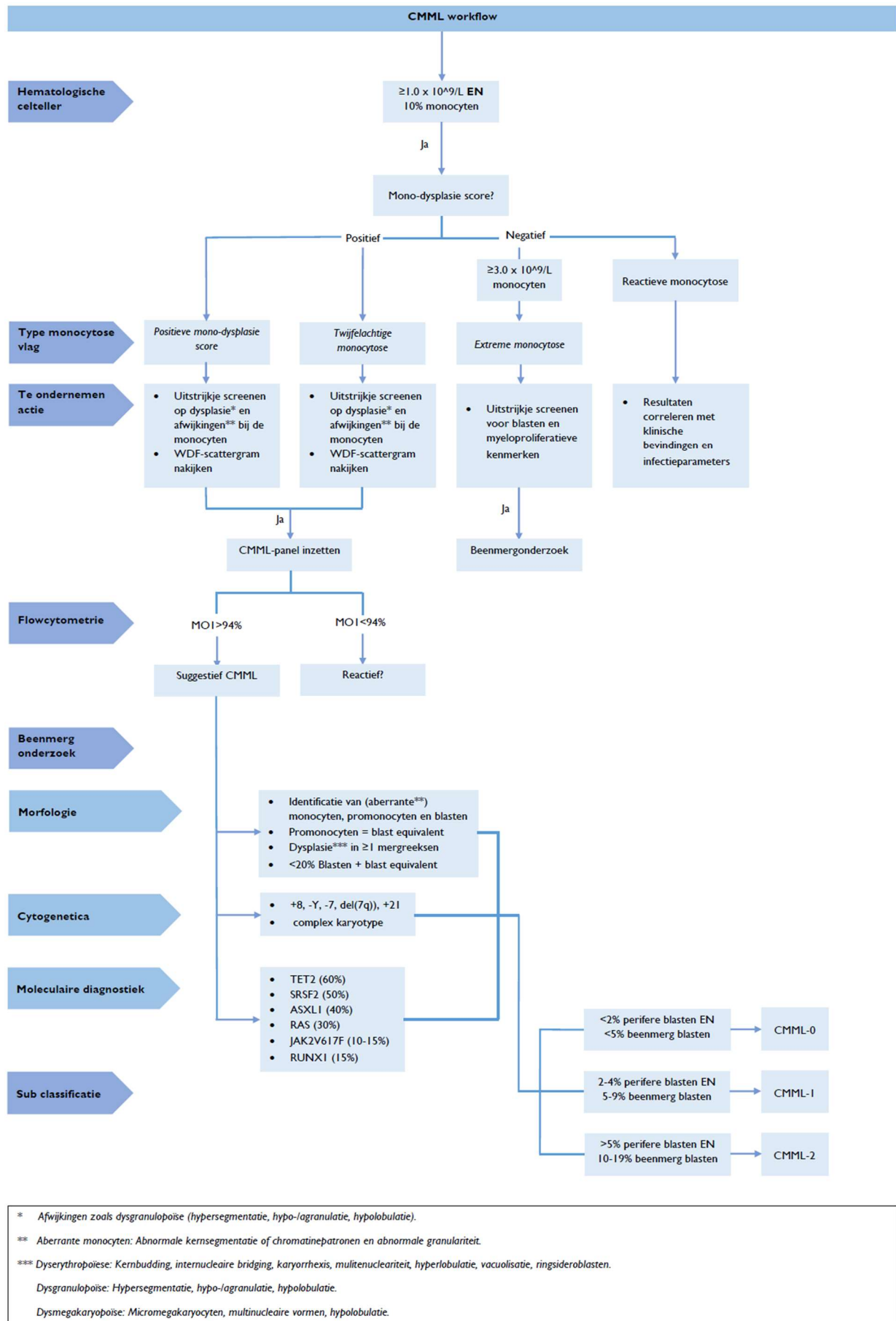
3 vals positieve stalen: Essentiële trombocytose, MDS-RS, negatieve NGS.

Tabel 8:

merkers oud panel	kleur	firma	Kloon	catalogoogr	Prijs/stuk	#testen/stuk	prijs per test
CD45	HV500	BD Biosciences	HI30	560777	360,99	100	1,8
CD24	APC-Vio770	Miltenyi Biotec	REA832	130-112-659	308	100	1,54
CD2	PerCP-Cy5,5	BD Biosciences	RPA-2.10	560643	181,44	50	7,26
CD56	PE	BD Biosciences	MY31	345810	286,65	100	1,43
CD33	APC	BD Biosciences	P67.6	345800	345,35	100	1,73
CD15	PE-Vio770	Miltenyi Biotec	VIMC6	130-114-012	131	30	2,18
CD16	FITC	BD Biosciences	CLB	656146	243,65	50	2,44
CD14	HV450	BD Biosciences	MφP9	560350	147,52	177,76	2,46
						TOTAAL	20,84 €
merkers nieuw panel	kleur	firma	Kloon	catalogoogr	Prijs/stuk	#testen/stuk	prijs per test
CD45	V500-C	BD Biosciences	2D1	655873	378,11	200	1,89
CD24	PE	BD Biosciences	ALB9	306069	550,6	400	1,38
CD2	APC	BD Biosciences	39C1.5	304608	517,38	100	1,29
CD56	PerCPCy5.5	BD Biosciences	N901	B49189	512,96	200	2,56
CD16	V450	BD Biosciences	3G8	644489	371,96	100	1,86
CD14	PE-Cy7	BD Biosciences	RM052	147220	544,04	60	1,36
						TOTAAL	10,35 €

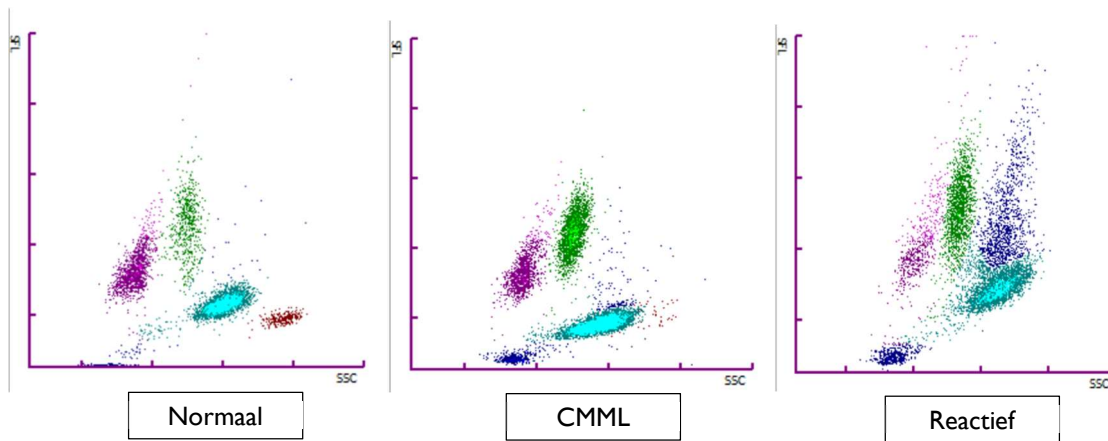
Overzichtstabel prijsberekening per monoklonaal antilichaam.

Figuur 6:



Schematische weergave van de diagnostische workflow bij het vermoeden van een CMML.

Figuur 7:



Weergave van drie WDF-scattergrammen van een normaal, CMML en reactief staal.