

CAT Critically Appraised Topic

Flowcytometrische scores bij MDS: een meerwaarde zonder meerkost?

Author: Astrid Muyldermans
Supervisor: Dr. J. Emmerechts
Date: 30 mei 2017

CLINICAL BOTTOM LINE

De diagnose van MDS is niet altijd eenduidig wanneer geen objectieve merkers, zijnde een verhoogd aantal blasten en/of ringsideroblasten in het beenmerg en/of kenmerkende chromosomale afwijkingen, gedetecteerd worden. In dergelijke gevallen is de diagnose hoofdzakelijk gebaseerd op de subjectieve morfologische beoordeling van het beenmerguitstrijkje. Als diagnostisch hulpmiddel voor deze categorie wordt flowcytometrie (FC) voorgesteld. Aan de hand van uitgebreid onderzoek van FC parameters zouden afwijkingen in de maturatiepatronen en aberrante merkerexpressie opgespoord kunnen worden. Door de hoge kostprijs, het gebrek aan standaardisatie en de uitgebreide expertise die nodig is voor de interpretatie van de resultaten, wordt FC analyse in de routinediagnostiek van MDS echter weinig toegepast. Met het oog op vereenvoudiging van het onderzoek naar MDS werden daarnaast flowcytometrische scoresystemen ontwikkeld. Een van de meest onderzochte en best gevalideerde FC scoresystemen bij MDS is deze ontwikkeld door Ogata *et al.*

In deze CAT werd de meerwaarde van de **Ogata-score** in de routinediagnostiek van MDS onderzocht. Een belangrijk voordeel naast de eenvoud is dat de Ogata-score zonder extra kost zou kunnen bepaald worden in AZ Sint-Jan. Het scoresysteem is immers gebaseerd op merkers (CD34/CD45) die aanwezig zijn in de Lymphoid Screening Tube (LST) die bij elk eerste beenmergstaal van een patiënt zonder voorgeschiedenis van een hematologische aandoening uitgevoerd wordt. De studie werd retrospectief uitgevoerd op 119 stalen (MDS n=32; MDS-AML n=5; CMML n=6; controle n=76). De sensitiviteit van de Ogata-score was eerder laag, vooral bij laag-risico MDS (55%) terwijl de diagnose op basis van de klassieke diagnostische merkers ook net bij deze categorie vaak niet eenduidig is. Bij MDS-EB-1/2 en MDS-AML werd een hogere sensitiviteit (80%) waargenomen, bij CMML een lage sensitiviteit (17%). Tegenover de lage sensitiviteit voor alle patiëntencategorieën stond echter een hoge specificiteit (92%). De Ogata-score lijkt op basis van onze bevindingen dus een meerwaarde in de routinediagnostiek, als aanvulling op de morfologische beoordeling en klinische gegevens, om MDS te suggereren bij een positieve score. En dit zonder meerkost.

In een tweede deel werd nagegaan of een **extended Ogata-score** een analytische meerwaarde zou kunnen hebben, zonder meerkost. Twee parameters werden toegevoegd die ook bepaald kunnen worden op basis van de LST en een aberrante expressie zouden vertonen bij MDS: CD56 op de myeloblasten en op de monocyt. Er werd binnen dezelfde populatie van 119 stalen een verhoogde sensitiviteit (laag-risico MDS 68%; hoog-risico MDS/MDS-AML/CMML 100%) waargenomen ten opzichte van de klassieke Ogata-score, maar dit ten koste van een sterk verlaagde specificiteit (54%). Deze negatieve invloed op de specificiteit bleek vermoedelijk te wijten te

zijn aan een vals positieve expressie van CD56 op de myeloblasten en monocytën. In de LST zijn zowel CD56 als kappa gekoppeld aan het fluorochroom PE en de aanwezigheid van kappa aan eenzelfde fluorochroom lijkt een aspecifieke reactie te veroorzaken op zowel de monocytën als de myeloblasten. Op basis van de LST die gebruikt wordt in AZ Sint-Jan kan dus geen onderscheid gemaakt worden tussen vals positieve en terecht positieve CD56 expressie. De extended Ogata-score op basis van de LST kan dan ook geen meerwaarde betekenen in AZ Sint-Jan.

Tot slot werd in een derde deel onderzocht of een nieuw panel **specifiek voor MDS**, opgesteld op basis van literatuuronderzoek en consensusrichtlijnen met merkers die binnen de terugbetalingscriteria van het RIZIV vallen, een analytische meerwaarde zou kunnen hebben. Dit panel werd samengesteld uit monoklonale antistoffen voor CD7/CD10/CD11b/CD15/CD19/CD34/CD45/CD56. Het discriminerend vermogen van deze merkers lijkt op basis van de beperkte prospectieve studie op 4 stalen van patiënten met MDS en 4 controlestalen van patiënten zonder MDS echter laag. Het inzetten van een extra panel vergt daarenboven extra werktijd en er worden meer kosten gegenereerd die vergoed moeten worden door het RIZIV. De implementatie van dit panel lijkt dan ook niet verantwoord, al is verdere evaluatie op een groter aantal stalen noodzakelijk.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Myelodysplastische syndromen (MDS) zijn een heterogene groep van klonale aandoeningen van de hematopoëtische stamcel, gekenmerkt door morfologische dysplasie in één of meerdere myeloïde cellijnen, ineffectieve hematopoëse en perifere cytopenie(ën). Het beenmerg (BM) is daarentegen over het algemeen hypercellulair of normocellulair.

Bij MDS bestaat een verhoogd risico op maligne transformatie met het ontwikkelen van acute myeloïde leukemie (AML). Hoewel dit het natuurlijk beloop is bij veel gevallen van MDS, varieert het risico op progressie naar AML echter sterk naargelang het subtype van MDS. Bij MDS met een verhoogd aantal blasten in perifeer bloed (PB) en BM is er een verhoogde kans op transformatie naar AML (13,14).

MDS is hoofdzakelijk een ziekte van de oudere populatie (mediane leeftijd 70 jaar) (13). De symptomen zijn gerelateerd aan de cytopenie(ën): de meerderheid van de patiënten zijn anemisch en vaak transfusiedependent. Neutropenie en/of trombopenie zijn minder frequent.

Persisterende cytopenie is dus een “sine qua non” voor MDS, maar de uiteindelijke **diagnose** zoals vooropgesteld door de World Health Organization (WHO), berust op beenmergcytomorfologie en cytogenetica.

MDS wordt opgedeeld in subtypes volgens de WHO-classificatie, waarbij vooral de graad van dysplasie (minstens 10% dysplastische cellen in minstens 1 cellijn), het percentage blasten in PB en BM (<20%, de drempel voor AML) en de aanwezigheid van ringsideroblasten van belang zijn (Bijlage 1). De verschillende morfologische subtypes worden in verband gebracht met een verschillende prognose (13,14).

In ±50% van de MDS gevallen wordt naast cytopenie ook een klonale cytogenetische afwijking gedetecteerd. Op basis van bepaalde wel gedefinieerde cytogenetische afwijkingen kan de diagnose MDS gesteld worden, zelfs in afwezigheid van dysplasie. Daarnaast bestaan chromosomale afwijkingen die in verband gebracht worden met MDS, maar niet voldoende diagnostisch zijn in afwezigheid van dysplasie (–Y, +8, of del(20q)). Enkel de chromosomale afwijking del(5q) definieert een specifiek MDS subtype volgens de WHO-classificatie; deze

afwijking komt vooral voor bij vrouwen, wordt geassocieerd met een karakteristieke dysplasie van de megakaryocyten (hypo- en monolobaire kern) en met een gunstige prognose. Naast hun diagnostische waarde zijn de cytogenetische bevindingen sterk gecorreleerd met de prognose, om die reden is het uitvoeren van een karyotypering op BM bij elke nieuwe casus dan ook van groot belang (13,14).

De diagnose is eenduidig als duidelijke objectieve afwijkingen, zijnde een verhoogd aantal blasten en/of ringsideroblasten en/of kenmerkende chromosomale afwijkingen gedetecteerd worden, maar deze afwijkingen worden bij slechts ongeveer de helft van de MDS gevallen gevonden. Als deze specifieke diagnostische merkers ontbreken berust de diagnose grotendeels op de aanwezigheid van morfologische dysplasie en dus op de subjectieve beoordeling van de onderzoeker (6,7). Er bestaat echter een belangrijke inter-rater variabiliteit in de morfologische beoordeling, vooral wanneer er slechts in één cellijn dysplasie is en er nog een belangrijke normale residuele hematopoëse is (7,14). Bovendien kan er een foutieve beoordeling van de aan- of afwezigheid van dysplasie zijn door een uitstrijkje of kleuring van slechte kwaliteit (vooral bij de beoordeling van de neutrofiele granulatie) (13).

De diagnose wordt verder bemoeilijkt doordat de dysplastische kenmerken ook kunnen voorkomen bij normale individuen en bij niet-klonale oorzaken van cytopenie(ën) (vitamine B₁₂- en foliumzuurdeficiëntie, virale infecties, ethanol, ...). Het is van groot belang de medische voorgeschiedenis in acht te nemen bij de beoordeling van myelodysplasie en niet-klonale oorzaken als mogelijke etiologie uit te sluiten. Herhaalde BM puncties en cytogenetische analyses kunnen nodig zijn (5,14).

Er is dus **nood aan bijkomende diagnostische hulpmiddelen**, vooral bij de laag-risico subtypes (i.e. zonder blastenexces) waar specifieke merkers ontbreken. De WHO 2008 classificatie van MDS erkent het nut van histopathologie, moleculaire biologie en flowcytometrie (FC) als bijkomende analyses.

Histopathologie kan helpen bij het uitsluiten van reactieve oorzaken en is belangrijk om de BM cellulariteit te beoordelen en fibrose te herkennen (7,13).

Verder worden op basis van moleculaire analyses steeds meer mutaties gevonden die in verband gebracht worden met MDS (ASXL1, TET2, ...). Deze mutaties zijn echter niet specifiek voor MDS, sommige kunnen bijvoorbeeld ook voorkomen bij gezonde oudere personen (Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential) (8). Meer onderzoek is nodig om de plaats van mutatie-analyses (bv. Next-Generation Sequencing) in de MDS-diagnostiek vast te stellen (7,14).

Over het nut van FC bij de diagnose van MDS werden ook reeds heel wat studies gepubliceerd. Uitgangspunt is dat de hematopoëtische cellen bij MDS een afwijkende maturatie en differentiatie vertonen, wat opgepikt kan worden met FC (1,9).

Immuunfenotypering van **CD34+ cellen** wordt reeds dikwijls toegepast bij MDS. Een toename in het aantal CD34+ cellen kan opgepikt worden met FC en een bijkomende evidentie zijn voor MDS (in evolutie). De differentiële telling van het aantal blasten op een uitstrijkje van PB of BM mag echter niet vervangen worden door het percentage bepaald met FC om een MDS subtype te definiëren volgens de WHO-classificatie (1,2,13). Een discordantie tussen beide bepalingen is mogelijk in geval van myelofibrose of hemodilutie (13).

Kwalitatieve en kwantitatieve afwijkingen in het **maturatiepatroon** van vooral de granulocyttaire en monocyttaire reeks, maar ook de erythroïde reeks en in mindere mate de megakaryocyttaire reeks zijn beschreven (2,16). Er is echter geen enkele immuunfenotypische merker of merkerprofiel specifiek voor MDS.

Eén enkele fenotypische afwijking mag dan ook niet als indicatief gezien worden; in de WHO-classificatie wordt vooropgesteld dat, in afwezigheid van morfologische of cytogenetische merkers, FC resultaten enkel als suggestief voor MDS mogen beschouwd worden als minstens drie afwijkingen in het maturatiepatroon waargenomen worden (13).

In een consensusgroep (samengesteld uit leden van de US National Comprehensive Cancer Network, International Working Group en European LeukemiaNet) werden een aantal minimale criteria voorgesteld voor de diagnose van MDS. Analyse van beenmergcellen met flowcytometrie werd in deze classificatie ook opgenomen als een belangrijke additionele test (co-criterium). Een aberrant fenotype maakt de aandoening sterk verdacht voor MDS, maar ook hier geldt dat de diagnose MDS niet mag gesteld worden in afwezigheid van morfologische of cytogenetische criteria. Opvolgstalen blijven nodig om te bepalen of een van de klassieke diagnostische merkers waargenomen wordt zodat de diagnose MDS gesteld kan worden (2).

Een groot **nadeel van FC bij MDS** is dat er weinig tot geen standaardisatie is, noch van (pre-)analytische factoren (antilichamen gebruikt in de panels, instellingen van de flowcytometer, ...), noch op vlak van interpretatie. Hierdoor wordt het gebruik in de routinediagnostiek bemoeilijkt (2-4,17,18). De interpretatie van abnormale patronen vereist een uitgebreide expertise en kennis van de normale expressiepatronen en er bestaat nog geen consensus over welke diagnostische parameters het meest geschikt zijn, maar verschillende werkgroepen zijn wel bezig met de internationale standaardisatie van FC bij MDS (1,6,10).

De European LeukemiaNet werkgroep (ELN) heeft in 2008 een consensus gedefinieerd om een aantal (pre-)analytische factoren van FC bij MDS te standaardiseren (BM, bij voorkeur in heparinebuis afgenomen, bewaring max. 24u op kamertemperatuur, minimum vier-kleuren FC, gedegranuleerde granulocyten bepalen op basis van SSC, ...). In 2012 werd in aanvulling hierop een consensus gepubliceerd door de ELN werkgroep over de minimale merkers die nodig zijn voor een correcte diagnose van MDS met FC (Bijlage 2) (1).

Het EuroFlow Consortium heeft in hun poging om flowcytometrie voor hematologische maligniteiten te standaardiseren ook antilichaampanelen ontwikkeld, onder andere voor de diagnose van MDS (Bijlage 3). Het protocol bevat naast de antilichaampanelen ook gestandaardiseerde procedures voor de cytometerinstellingen, staalvoorbereiding en data-analyse. Dit protocol kan gebruikt worden in combinatie met de Infinicyt software voor de analyse van de resultaten zodat afwijkingen in de maturatie op een relatief objectieve manier beoordeeld kunnen worden (Cytognos Infinicyt™ Flow Cytometry Software) (4,10).

Naast het gebrek aan standaardisatie en de uitgebreide expertise die nodig is voor het herkennen van abnormale patronen, is een derde belangrijk bezwaar voor het routinematig gebruik van FC in de diagnostiek van MDS, de kostprijs. Voor patroonherkenning zijn immers uitgebreide panels nodig en hoogopgeleid personeel. Zo zijn voor de methode die voorgesteld wordt door de ELN werkgroep minimaal 18 monoklonale antilichamen nodig (naast de backbone merkers die aan elke buis toegevoegd worden) (1). Bij het EuroFlow antilichaampanel worden voor MDS minimum vier buizen met elk acht antilichamen gebruikt (10). Indien het EuroFlow panel uitgevoerd zou worden bovenop de Lymphoid Screening Tube (LST) (12 merkers) in AZ Sint-Jan, betekent dit dat 44 merkers gebruikt zouden worden. Voor FC analyse bij MDS worden door het RIZIV echter slechts maximum 18 merkers terugbetaald: de eerste merker kan vergoed worden volgens nomenclatuurnummer 555730 – 555741 (B500), de 12 volgende merkers volgens 556474 – 556485 (B400), voor 5 lymfocyttaire merkers zijn tot slot een vergoeding volgens 555693 – 555704 (B200) mogelijk. Volgens de huidige B-waarde (€0,030868) kan dus maximum een vergoeding van €194,47 verkregen worden (15). Met dit bedrag kan de totale kost van de analyse en interpretatie echter niet gedekt worden.

Het gebruik van flowcytometrische **scoresystemen** kan helpen in de standaardisatie van FC bij MDS. Enkel de merkers die gedefinieerd worden in de score worden gebruikt, en de interpretatie kan vereenvoudigd worden. De scoresystemen zijn gebaseerd op het feit dat bij MDS patiënten meer afwijkingen waargenomen worden dan bij controlegroepen. De afwijkingen kunnen in een score vertaald worden en vanaf een bepaalde grens wordt de score als positief voor MDS beschouwd.

Een klinische evaluatie van de verschillende FC panels en scoresystemen voor MDS vormden reeds het onderwerp van een voorgaande CAT (CAT S. Pauwels, 2010) (19). Het bestuderen van de panels en scoresystemen was dan ook niet het opzet van de huidige CAT, er zijn immers weinig veranderingen in consensusrichtlijnen anno 2017 ten opzichte van 2010 en ook in de revisie van de WHO classificatie in 2016 werden geen nieuwe gegevens betreffende FC bij MDS gepubliceerd (14). Op basis van de CAT van S. Pauwels kan geconcludeerd worden dat door de relatief lage sensitiviteit zoals beschreven in de literatuur, en het blijvend gebrek aan standaardisatie, het inzetten van extra panels voor MDS niet gerechtvaardigd is. Het doel van de huidige CAT is daarom na te gaan of informatie kan ingewonnen worden over MDS op basis van de merkers die momenteel reeds ingezet worden, zonder het gebruik van extra panels. In AZ Sint-Jan wordt bij elk eerste beenmergstaal van een patiënt zonder voorgeschiedenis van een hematologische aandoening naast het morfologisch onderzoek ook een FC analyse uitgevoerd. Hiervoor wordt een aangepaste versie van de LST buis van het EuroFlow Consortium gebruikt waarbij ook monoklonale antistoffen tegen CD34 toegevoegd worden (Tabel 1). Momenteel is de informatie die uit het panel gehaald wordt beperkt bij MDS, het is een indicatie voor het blastenpercentage (maar mag de morfologische telling niet vervangen voor de WHO-classificatie, cfr. supra) en wordt gebruikt voor het uitsluiten van andere klonale aandoeningen. In dit panel zijn echter de merkers aanwezig die nodig zijn voor het bepalen van de Ogata-score, een van de meest onderzochte en best gevalideerde FC scoresystemen bij MDS. Als een alternatief voor de uitgebreide panels die gebruikt worden bij patroonherkenning, werd door Ogata *et al.* een simpel FC protocol voorgesteld, hoofdzakelijk gebaseerd op de oppervlaktemerkers CD45 en CD34 (5). De interpretatie van FC resultaten bij deze score is eenvoudig en de kost is veel lager dan bij de uitgebreide panels voor het opsporen van aberrante maturatiepatronen. Op basis van deze score werden vervolgens ook “extended Ogata-scores” onderzocht door verschillende studiegroepen waarbij extra parameters toegevoegd werden (5,7).

In deze CAT werd onderzocht of de implementatie van de **Ogata-score** berekend op basis van de LST buis een meerwaarde kan betekenen in de routinediagnostiek van AZ Sint-Jan, zonder dat het een meerkost met zich meebrengt. In een tweede deel werd nagegaan of een **extended Ogata-score** een analytische meerwaarde kan hebben, eveneens gebaseerd op merkers aanwezig in de LST en dus zonder meerkost. Tot slot werd in een derde deel onderzocht of een **specifiek MDS panel**, opgesteld op basis van literatuuronderzoek en consensusrichtlijnen met merkers die binnen de terugbetalingscriteria van het RIZIV vallen, een analytische meerwaarde zou kunnen hebben.

QUESTION(S)

- 1) Kan de Ogata-score een meerwaarde betekenen in de routinediagnostiek van MDS in AZ Sint-Jan, zonder meerkost?
- 2) Kan een extended Ogata-score een meerwaarde betekenen in de routinediagnostiek van MDS in AZ Sint-Jan, zonder meerkost?
- 3) Kan een specifiek MDS panel voor flowcytometrie een meerwaarde betekenen in de routinediagnostiek van MDS in AZ Sint-Jan? Wat is de meerkost?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: ("myelodysplastic syndromes", "MDS and diagnosis", "MDS and flow cytometry", "MDS and flow cytometric score", "Ogata and flow cytometry")
- 2) World Health Organization
- 3) CAT-bibliotheek (<http://www.uzleuven.be/laboratoriumgeneeskunde>)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

- 1) *Guidelines and Recommendations*
 1. Westers TM, Ireland R, Kern W, Alhan C, Balleisen JS, Bettelheim P, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia*. 2012;26:1730-41.
 2. Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res*. 2007;31(6):727-36.
 3. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Béné MC, Della Porta MG, Dräger AM, Feuillard J, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2009;94(8):1124-34.
- 2) *Reviews*
 4. Aanei CM, Picot T, Tavernier E, Guyotat D, Campos Catafal L. Diagnostic Utility of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes. *Front Oncol*. 2016;6(161):1-9.
- 3) *Original Articles*
 5. Ogata K, Della Porta MG, Malcovati L, Picone C, Yokose N, Matsuda A, et al. Diagnostic utility of flow cytometry in low-grade myelodysplastic syndromes: a prospective validation study. *Haematologica*. 2009;94(8):1066-74.
 6. Della Porta MG, Picone C, Pascutto C, Malcovati L, Tamura H, Handa H, et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. *Haematologica*. 2012;97(8):1209-17.
 7. Bardet V, Wagner-Ballon O, Guy J, Morvan C, Debord C, Trimoreau F, et al. Multicentric study underlining the interest of adding CD5, CD7 and CD56 expression assessment to the flow cytometric Ogata score in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2015;100(4):472-8.
 8. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015;126(1):9-16.
 9. Xu F, Li X, Wu L, He Q, Zhang Z, Chang C. Flow cytometric scoring system (FCMSS) assisted diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS) and the biological significance of FCMSS-based immunophenotypes. *Br J Haematol*. 2010;149(4):587-97.
 10. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26:1908-1975.
 11. Lacronique-Gazaille C, Chaury MP, Le Guyader A, Faucher JL, Bordessoule D, Feuillard J. A simple method for detection of major phenotypic abnormalities in myelodysplastic syndromes: expression of CD56 in CMML. *Haematologica*. 2007;92(6):859-60.

12. Heron M, Dovert E, Bakker-Jonges LE, Posthuma EFM, Brouwer RE, Smedts F, et al. Translating the MDS Flow Cytometric Score into Clinical Practice. *Cytometry B Clin Cytom.* 2015;88(3):207-9.
- 4) *Reference Works, Handbooks and Databases*
13. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.
14. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-405.
15. RIZIV. NomensSoft: nomenclatuur en pseudonomenclatuur van de geneeskundige verstrekkingen. <http://www.riziv.fgov.be>. Laatst geraadpleegd op 22 mei 2017.
- 5) *Posters, "grey literature", presentations*
16. van de Loosdrecht. Presentatie: Improving the role of Flow Cytometry for the characterization of Myelodysplastic Syndromes. American Society of Hematology, New Orleans, 6 december 2013.
17. Detry G, Staquet L, De Lavaley M, Husson B. Abstract: Myelodysplastic score in flow cytometry. Belgian Society for Advancement of Cytometry, Brussel, 21 oktober 2016.
18. De Lavaley M, Staquet L, Husson B, Detry G. Abstract : A multiparametric flow cytometric scoring system as a diagnostic tool in myelodysplastic syndromes. Belgian Society for Advancement of Cytometry, Brussel, 21 oktober 2016.
19. Pauwels S. CAT: Nut van flowcytometrie bij MDS. 2010. <https://www.uzleuven.be/laboratoriumgeneeskunde>.

APPRAISAL

Bij elk eerste beenmergstaal van een patiënt zonder voorgeschiedenis van een hematologische aandoening wordt in AZ Sint-Jan een FC analyse uitgevoerd met een Lymphoid Screening Tube (LST). Een voorbeeld hiervan wordt weergegeven in Bijlage 4. De LST buis die gebruikt wordt in AZ Sint-Jan is een aangepaste versie van het antilichaampanel van het EuroFlow Consortium. In AZ Sint-Jan worden ook monoklonale antistoffen tegen CD34 toegevoegd aan het panel, de antistoffen tegen TCR γ/δ worden weggelaten (Tabel I). Dankzij de aanwezigheid van CD34 is het mogelijk om de Ogata-score op basis van de LST te bepalen. De pre-analytische condities (staalvoorbereiding, cytometerinstellingen, ...) worden uitgevoerd volgens de EuroFlow criteria en de analyse gebeurt met een FACSCantoll flowcytometer en FACSDiva software (BD, Erembodegem) (10).

Tabel I. LST – EuroFlow vs. AZ Sint-Jan.

Fluorochroom	EuroFlow	AZ Sint-Jan
HV450	CD20	CD20
HV450	CD4	CD4
HV500	CD45	CD45
FITC	CD8	CD8
FITC	Lambda	Lambda
PE	Kappa	Kappa
PE	CD56	CD56
PerCP-Cy5.5	CD5	CD5
PerCP-Cy5.5	-	CD34
PE-Cy7	TCRγ/δ	-
PE-Cy7	CD19	CD19
APC	CD3	CD3
APC-H7	CD38	CD38

VRAAG 1. KAN DE OGATA-SCORE EEN MEERWAARDE BETEKENEN IN DE ROUTINEDIAGNOSTIEK VAN MDS IN AZ SINT-JAN, ZONDER MEERKOST?

In het eerste deel van deze CAT werd de meerwaarde van de Ogata-score in de routinediagnostiek van MDS in AZ Sint-Jan bepaald. Dit is het meest gekende en best gevalideerde scoresysteem en wordt in de literatuur voorgesteld als een belangrijk diagnostisch hulpmiddel (5-7).

1.1 Patiënten

De studie werd retrospectief uitgevoerd op beenmergstalen (n=119) afgenomen tussen 01/01/2016 en 31/12/2016. Het betrof stalen van patiënten zonder voorgeschiedenis van (hematologische) maligniteiten bij wie er op basis van de kliniek vraag was naar diagnose/uitsluiten van MDS en patiënten met onverklaarde perifere cytopenie(ën). Bij deze patiënten werd op het moment van het morfologisch beenmergonderzoek eveneens een FC onderzoek uitgevoerd met de LST buis.

Tabel 2. Patiëntkarakteristieken retrospectieve studie (n=119).

	Aantal (M/V)	Gemiddelde leeftijd (range)	Transfusie- afhankelijk	Afwijkend karyotype
1. MDS (n=32)				
Laag-risico (n= 22)				
SLD	4 (4/0)	70 (65-79)	2 (50%)	3 (75%)
MLD	13 (9/4)	72 (46-88)	10 (77%)	5 (38%)
RS-SLD	1 (1/0)	67	1 (100%)	0
RS-MLD	1 (0/1)	78	1 (100%)	0
5q-	3 (1/2)	79 (73-83)	1 (33%)	3 (100%)
Hoog-risico (n=10)				
EB-1	4 (1/3)	71 (49-85)	2 (67%) ¹	2 (50%)
EB-2	6 (3/3)	68 (57-78)	6 (100%)	2 (40%) ²
2. AML-MDS (n=5)				
	5 (2/3)	70 (33-83)	4 (80%)	3 (75%) ³
3. CMML (n=6)				
	6 (4/2)	75 (71-81)	3 (50%)	2 (33%)
4. CONTROLE (n=76)				
Anemie bij chronische ziekte	5 (4/1)	56 (40-72)		
Renale anemie	8 (6/2)	69 (47-86)		
Leverpathologie	5 (3/2)	65 (53-71)		
Ijzerdeficiëntie	4 (3/1)	82 (79-85)		
Vitamine B ₁₂ /FZ deficiëntie	1 (1/0)	48		
latrogene anemie ⁴	2 (1/1)	63 (62-63)		
AIHA	1 (0/1)	58		
ITP	14 (5/9)	55 (13-83)		
Immuunpancytopenie	1 (1/0)	34		
Reactieve cytopenie (toxisch/infecties)	6 (5/1)	70 (45-94)		
Idiopathische cytopenie	21 (15/6)	59 (20-87)		
Cytopenie door beenmerginvasie	8 (4/4)	70 (46-82)		

¹na diagnose werd 1 patiënt opgevolgd in een ander centrum, transfusie-afhankelijkheid niet gekend; ²bij 1 patiënt werden onvoldoende mitosen verkregen voor karyotypering; ³bij 1 patiënt werd de karyotypering niet uitgevoerd omwille van het overlijden daags na de diagnose; ⁴omvat medicatie-geïnduceerde anemie.

SLD=single lineage dysplasia; MLD=multilineage dysplasia; RS=met ringsideroblasten; 5q-=met del(5q); EB=met exces aan blasten; AML=acute myeloïde leukemie; CMML=chronische myelomonocytair leukemie; FZ= foliumzuur; AIHA=auto-immuun hemolytische anemie; ITP=immuun trombopenie.

Als gouden standaard voor de studie werd in het elektronisch patiëntendossier (EPD) nagegaan wat de uiteindelijke diagnose van de arts was op basis van de resultaten van het cytomorfologisch en cytogenetisch onderzoek en het uitsluiten van andere pathologieën. Patiënten bij wie de definitieve diagnose nog niet gesteld werd of die overleden waren voor een definitieve diagnose kon gesteld worden, werden geëxcludeerd. Op basis van de uiteindelijke diagnose werden de patiënten ingedeeld in vier hoofdgroepen: MDS (n=32), AML met MDS-related changes (AML-MDS, n=5), chronische myelomonocytaire leukemie (CMML, n=6) en een controlegroep (n=76) (Tabel 2).

De MDS patiënten werden verder ingedeeld in een laag-risico subgroep bij afwezigheid van blastenexces en een hoog-risico subgroep bij aanwezigheid van blastenexces volgens de WHO-criteria (13). Er werd gekozen voor deze indeling en geen indeling volgens de International Prognostic Score System (IPSS) en WHO classification-based prognostic scoring system (WPSS) waarbij ook rekening gehouden wordt met karyotypering, omdat dit een opdeling in meer dan twee categorieën impliceert waardoor een te laag aantal patiënten per groep zouden weerhouden worden. Bovendien gebeurde ook in eerder uitgevoerde studies waarop ons onderzoek gebaseerd is het onderscheid op basis van het al dan niet aanwezig zijn van een exces aan blasten (5-7).

De Ogata-score werd in de eerste plaats ontwikkeld als diagnostisch hulpmiddel bij laag-risico MDS, maar zou ook toegepast kunnen worden bij het diagnosticeren van hoog-risico MDS, AML-MDS en MDS/myeloproliferatieve neoplasie (MPN) overlap syndromen (5-7). Van de MDS/MPN groep werd de Ogata-score vooral bij CMML onderzocht in de literatuur, de overige MDS/MPN subtypes zijn zeldzaam (7,11).

1.2 Methode

De Ogata-score is opgebouwd uit vier **parameters** waarvan een immuunfenotypische afwijking frequent gerapporteerd wordt bij MDS. Deze parameters werden verkozen voor het scoresysteem omdat ze, wanneer ze gecombineerd worden, in staat zouden zijn patiënten met MDS correct te onderscheiden van patiënten met een niet-klonale cytopenie, en omdat ze reproduceerbaar zijn tussen verschillende laboratoria. Per parameter die buiten de normale range ligt, wordt een punt gegeven (Tabel 3). Het resultaat is positief voor MDS bij een score $\geq 2/4$.

Tabel 3. Berekening Ogata-score voor MDS (5).

FC parameter	Cut-off	Score
1. Myeloblasten op alle CD45+ cellen (%)	≥ 2	1
2. Lymfoblasten op alle CD34+ cellen (%)	≤ 5	1
3. Ratio MFI lymfocyten over MFI myeloblasten op CD45	≤ 4 of ≥ 7.5	1
4. Ratio SSC granulocyten over SSC lymfocyten	≤ 6	1

Voor deze studie werd een **sjabloon** opgesteld in AZ Sint-Jan waarin de FC resultaten weergegeven worden onder vorm van de plots en statistiekwaarden die nodig zijn om de Ogata-score te berekenen (Bijlage 5). In dit sjabloon werden de FC resultaten geïmporteerd van de patiënten die geselecteerd werden (1.1 Patiënten) (FC resultaten worden in AZ Sint-Jan bewaard onder vorm van FCS files die in een nieuw sjabloon geïmporteerd kunnen worden).

De **gating** werd geblindeerd uitgevoerd in die zin dat de onderzoeker geen kennis had van de morfologische resultaten, noch van de uiteindelijke diagnose bij de patiënt. Een voorbeeld van de gatingstrategie wordt getoond in Bijlage 5. Deze gatingstrategie is licht aangepast ten opzichte van deze voorgesteld door Ogata *et al.*:

- De **blasten** werden in onze studie gated op een CD45/SSC plot ($CD45^{\text{relatief laag}}SSC^{\text{relatief laag}}$) en deze populatie werd vervolgens geplotted op een CD34/SSC plot. De CD34⁺ fractie werd uitgezet op een CD19/CD34 plot om zo de myeloblasten ($CD34^+CD19^-$) en de lymfoblasten ($CD34^+CD19^+$) te definiëren. Het labelen van CD19 is een aanvulling op de gating volgens Ogata *et al.* om eenduidig de myeloblasten en lymfoblasten te onderscheiden. In een studie van de Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM) en de Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies (GEIL) werd deze gatingstrategie gevalideerd (5,7).

- De **granulocyten** werden in de studie van Ogata *et al.* gated op een CD45/SSC plot ($CD45^{\text{hoog}}SSC^{\text{hoog}}$) en deze populatie werd vervolgens uitgezet op een CD10/CD34 plot. De uiteindelijke granulocytenpopulatie werd gedefinieerd als de CD10 negatieve celfractie. Deze tweede stap werd niet uitgevoerd in onze studie vermits CD10 niet aanwezig is in de LST buis.

In de studie van Ogata *et al.* werd vermeld dat er geen significant verschil is in de discriminerende kracht van de granulocyten/lymfocyten SSC parameter wanneer enkel de CD10- granulocyten of alle granulocyten gebruikt worden, maar de reden dat door de groep toch de voorkeur gegeven werd aan het gebruik van de CD10- fractie is omdat hierdoor minder invloed van contaminatie met perifeer bloed zou ondervonden worden. De meeste circulerende neutrofielen brengen immers CD10 tot expressie (5).

In een latere validatiestudie van de ELN groep waarbij ook de groep van Ogata *et al.* betrokken was, werden enkel de monoklonale antilichamen CD34 en CD45 gebruikt. De granulocyten werden hier, net zoals in onze studie, gedefinieerd als $CD45^{\text{hoog}}SSC^{\text{hoog}}$ (6).

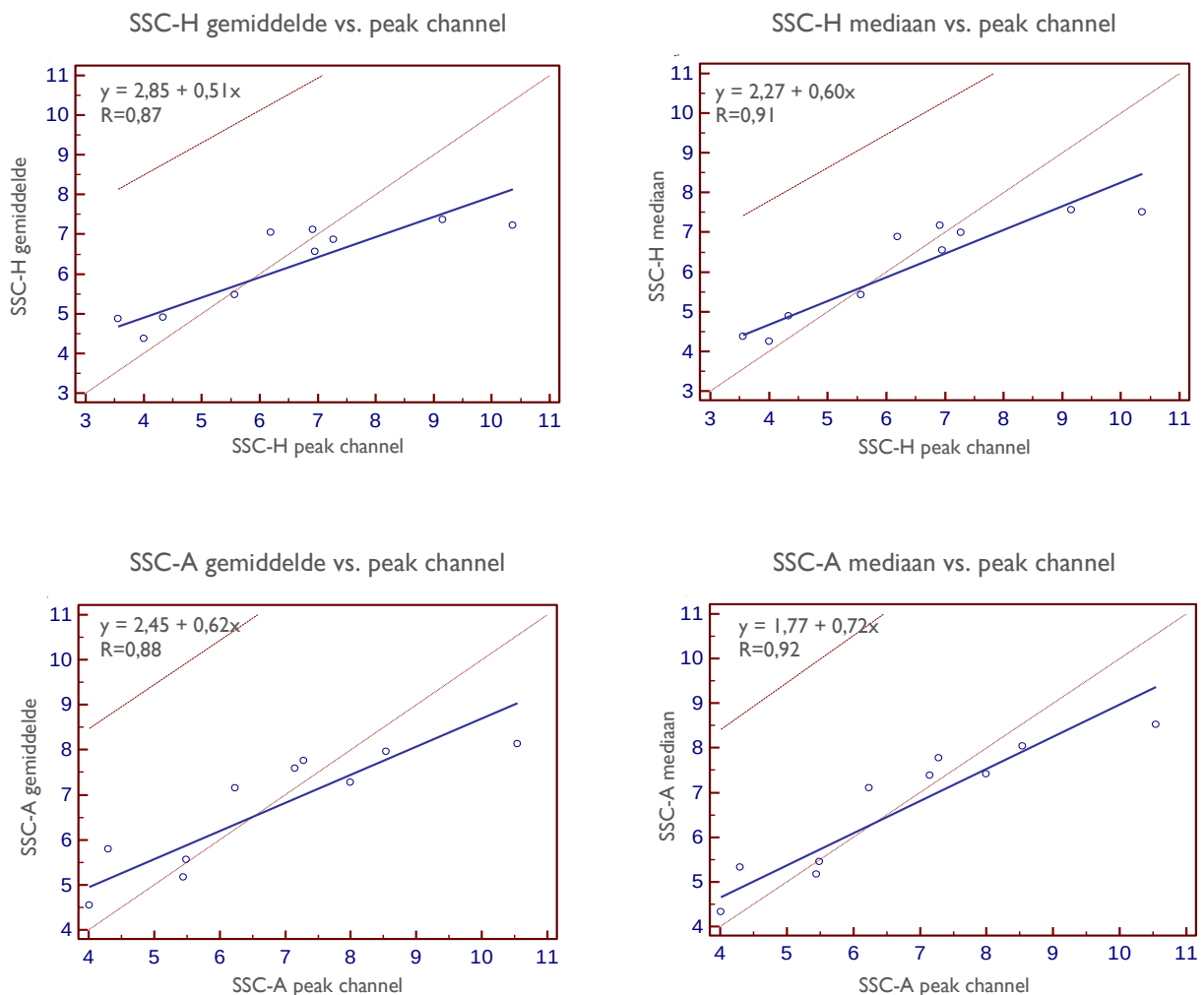
- Voor de vierde parameter (Tabel 3) wordt gebruik gemaakt van de **SSC** van de granulocyten en lymfocyten. Meer bepaald wordt de “side scatter peak channel ratio” gebruikt, gedefinieerd als het SSC kanaalnummer waar het maximum aantal granulocyten, respectievelijk lymfocyten gevonden wordt (5). Deze parameter kan echter niet door de FACSDiva software berekend worden en berust dus op de subjectieve schatting van de analist van waar de populatie een maximum in SSC vertoont (7). Omdat we een reproduceerbare score beogen hebben we nagegaan of deze SSC peak channel ratio vervangen kan worden door het SSC gemiddelde of de SSC mediaan die wel berekend kunnen worden met de software. Bovendien is het in de studie van Ogata *et al.* niet duidelijk of gebruik gemaakt wordt van de SSC-Height (SSC-H) of SSC-Area (SSC-A). Voor dit preliminaire onderzoek werd een korte validatie uitgevoerd op 10 beenmergstalen: vijf beenmergstalen van patiënten waarbij de uiteindelijke diagnose MDS was en vijf beenmergstalen van patiënten met perifere cytopenie(ën) die niet gediagnosticeerd werden als MDS.

Er werd een Passing-Bablok analyse uitgevoerd voor het vergelijken van de resultaten wanneer SSC gemiddelde (zoals bepaald door de software) gebruikt werd ten opzichte van wanneer SSC peak channel (zoals ingeschat door de analist) gebruikt werd enerzijds en anderzijds voor het vergelijken van de resultaten wanneer SSC mediaan (zoals bepaald door de software) gebruikt werd ten opzichte van SSC

peak channel (zoals ingeschat door de analist). Deze analyse werd gedaan zowel voor het gebruiken van SSC-H als SSC-A (Figuur 1).

Enkel bij het gebruik van SSC-A mediaan werd geen systematisch of proportioneel verschil waargenomen ten opzichte van de peak channel (95% CI intercept=-0,26 tot 4,18; 95% CI slope=0,41 tot 1,06). Verder kan opgemerkt worden dat de correlatiecoëfficiënt voor SSC-A steeds hoger ligt dan voor SSC-H en voor mediaan steeds hoger ligt dan voor gemiddelde. De betere resultaten bij het gebruiken van mediaan ten opzichte van gemiddelde liggen in de lijn van de verwachtingen vermits we te maken hebben met niet-Gaussiaanse verdelingen. De Ogata-score bleef ongewijzigd, ongeacht de gebruikte parameters.

Voor deze studie werd aldus geopteerd om de mediaan van SSC-A te gebruiken ter vervanging van de SSC peak channel.



Figuur 1. Passing-Bablok analyse: vergelijking SSC-H vs. SSC-A vs. peak channel – gemiddelde vs. mediaan vs. peak channel.

I.3 Resultaten

I.3.1 Sensitiviteit

De gevoeligheid van de Ogata-score werd bepaald op 43 stalen van patiënten met als definitieve diagnose laag-risico MDS, hoog-risico MDS, AML-MDS en CMML. De resultaten van deze analyse worden weergegeven in Tabel 4.

Tabel 4. Resultaten Ogata-score.

Ogata-score								
	- 0	1	+ 2	3	4	Positieve gevallen	Sensitiviteit	Specificiteit
1. MDS (n=32)								
Totaal						20/32	63%	
Laag-risico (n= 22)						12/22	55%	
SLD	0	2	2	0	0	2/4	50%	
MLD	5	1	4	3	0	7/13	54%	
RS-SLD	0	0	1	0	0	1/1	100%	
RS-MLD	1	0	0	0	0	0/1	0%	
5q-	1	0	1	1	0	2/3	67%	
Hoog-risico (n=10)						8/10	80%	
EB-1	0	1	1	2	0	3/4	75%	
EB-2	0	1	1	2	2	5/6	83%	
2. AML-MDS (n=5)								
	0	1	3	0	1	4/5	80%	
3. CMML (n=6)								
	0	5	0	1	0	1/6	17%	
4. CONTROLE (n=76)								
Totaal						6/76		92%
Anemie bij chronische ziekte	3	2	0	0	0	0/5		100%
Renale anemie	3	4	0	1	0	1/8		88%
Leverpathologie	2	3	0	0	0	0/5		100%
Ijzerdeficiëntie	2	1	1	0	0	1/4		75%
Vitamine B ₁₂ /FZ deficiëntie	1	0	0	0	0	0/1		100%
Iatrogene anemie	1	1	0	0	0	0/2		100%
AIHA	1	0	0	0	0	0/1		100%
ITP	12	2	0	0	0	0/14		100%
Immuunpancytopenie	0	0	1	0	0	1/1		0%
Reactieve cytopenie (toxisch/infecties)	0	4	2	0	0	2/6		67%
Idiopathische cytopenie	14	6	1	0	0	1/21		95%
Cytopenie door beenmerginvasie	2	6	0	0	0	0/8		100%

a. Laag-risico MDS

De gevoeligheid (55%) van de Ogata-score is relatief laag voor laag-risico MDS. MDS kan bij een negatieve Ogata-score dus niet met zekerheid uitgesloten worden omwille van de vele vals negatieve resultaten. Er zijn onvoldoende stalen aanwezig om belangrijke besluiten te trekken over de performantiekarakteristieken binnen elk subtype (Tabel 4).

Vooraf bij de laag-risico MDS patiënten waarbij geen klassieke diagnostische merkers voor MDS waargenomen worden (RS, del(5q) of andere chromosomale afwijkingen geassocieerd met MDS volgens de WHO-classificatie) is het stellen van een diagnose vaak moeilijk en zou de Ogata-score dus een belangrijke meerwaarde kunnen bieden (13). Er werd in onze studie echter steeds een lage gevoeligheid van de Ogata-score gevonden, onafhankelijk de aan- of afwezigheid van klassieke diagnostische merkers (Tabel 5).

Tabel 5. Laag-risico MDS met vs. zonder klassieke diagnostische merkers*, resultaten Ogata-score.

Ogata-score						Positieve gevallen	Sensitiviteit
-	0	1	2	3	4		
0	1	2	3	4	5		
MDS met klassieke diagnostische merker							
	4	2	5	2	0	7/13	54%
MDS zonder klassieke diagnostische merker							
	3	1	3	2	3	5/9	56%

*RS, del(5q) of andere chromosomale afwijkingen geassocieerd met MDS volgens de WHO-classificatie

Zowel bij patiënten van wie het beenmerg morfologisch duidelijk suggestief was voor MDS (sensitiviteit 50%), als bij deze van wie het morfologisch beeld twijfelachtig was (sensitiviteit 67%), werd een lage sensitiviteit waargenomen voor de Ogata-score (Tabel 6).

Bij de meerderheid van de stalen van patiënten met laag-risico MDS bij wie klassieke diagnostische merkers voor MDS aanwezig waren (n=13), was ook het morfologisch beeld reeds suggestief voor MDS: het morfologisch beeld was positief voor MDS bij 2/2 stalen met RS, 3/3 stalen met del(5q), 5/8 stalen met een afwijkend karyotype (anders dan del(5q)). Ook in 6/9 stalen van patiënten zonder klassieke diagnostische merkers was het morfologisch beeld suggestief voor MDS (Tabel 6).

Tabel 6. Laag-risico MDS met vs. zonder morfologische dysplasie, resultaten Ogata-score.

		Ogata-score					Positieve gevallen	Sensitiviteit
		- 0	1	+ 2	3	4		
Morfologie +	Diagnose +	7 ¹	1 ²	4 ⁴	4 ⁶	0	8/16	50%
Morfologie ±	Diagnose +	0	2 ³	4 ⁵	0	0	4/6	67%
Morfologie -	Diagnose +	0	0	0	0	0	0/0	/

Morfologie+: morfologisch beeld kan, na uitsluiten van secundaire oorzaken, passen bij MDS;

Morfologie±: morfologisch beeld niet conclusief: randsignificante dysplasie, beginnende MDS niet uit te sluiten, niet-representatief (celarm, perifeer bijgemengd)

Morfologie-: morfologisch beeld bij voorkeur reactief

Diagnose+: uiteindelijke diagnose van behandelde arts op basis van cytomorfologie, cytogenetica, kliniek en uitsluiten van andere oorzaken is MDS.

¹3 patiënten zonder klassieke diagnostische merkers – 1 patiënt met RS, 1 met del(5q), 2 met afwijkend karyotype

²1 patiënt met afwijkend karyotype

³1 patiënt zonder klassieke diagnostische merkers – 1 patiënt met afwijkend karyotype

⁴1 patiënt zonder klassieke diagnostische merkers – 1 patiënt met RS, 1 met del(5q), 1 met afwijkend karyotype

⁵2 patiënten zonder klassieke diagnostische merkers – 2 patiënten met afwijkend karyotype

⁶2 patiënten zonder klassieke diagnostische merkers – 1 patiënt met del(5q), 1 met afwijkend karyotype

b. Hoog-risico MDS

Bij 8 van de 10 stalen van patiënten met hoog-risico MDS werd een correcte diagnose weerhouden op basis van de Ogata-score (gevoeligheid 80%). De gevoeligheid van de Ogata-score voor hoog-risico MDS ligt dus duidelijk hoger dan voor laag-risico MDS. Bij deze patiënten was echter ook het morfologisch beeld steeds suggestief voor MDS in overeenstemming met de definitieve diagnose van de behandelende arts; de Ogata-score had bij deze groep dus geen belangrijke meerwaarde kunnen betekenen ten opzichte van de morfologische beoordeling (Tabel 4).

c. AML-MDS

De gevoeligheid (80%) van de Ogata-score voor AML-MDS ligt in de lijn van de gevoeligheid voor hoog-risico MDS. Ook bij deze groep was het morfologisch beeld echter steeds suggestief voor AML-MDS en had de Ogata-score dus geen belangrijke meerwaarde kunnen betekenen ten opzichte van de morfologische beoordeling (Tabel 4).

d. CMML

In slechts 1 van de 6 geïncubeerde stalen van patiënten met CMML, werd een Ogata-score hoger dan de cut-off waargenomen (Tabel 4). De gevoeligheid (17%) voor het gebruik van de Ogata-score bij CMML ligt heel wat lager dan wat verwacht werd op basis van gegevens in een studie van de GFM en GEIL groep waar de Ogata-score was toegenomen bij de meerderheid van de MDS/MPN gevallen, met een eerder goede sensitiviteit, en gesuggereerd werd dat de score eveneens gebruikt kan worden als een routine diagnostische tool in MDS/MPN, hoofdzakelijk CMML (cfr. infra, Discussie) (7).

1.3.2 Specificiteit

De specificiteit van de Ogata-score werd bepaald op 76 controlestalen van patiënten bij wie er vraag was naar MDS op basis van de kliniek en patiënten met onverklaarde perifere cytopenieën, maar bij wie de definitieve diagnose geen MDS was. De resultaten van deze analyse worden weergegeven in Tabel 4.

Er werd een hoge specificiteit (92%) waargenomen. Een positieve Ogata-score kan dus suggestief beschouwd worden voor MDS omwille van de weinig vals positieve resultaten. Er werden onvoldoende controlestalen geïncubeerd per categorie om belangrijke besluiten te trekken over de performantiekarakteristieken van de Ogata-score binnen elk subtype.

In de meerderheid van de controlestalen was de morfologie niet suggestief voor MDS. Bij 13 controlestalen was er echter een twijfelachtig morfologisch beeld, en in deze groep werd zelfs een specificiteit van 100% waargenomen voor de Ogata-score. De score zou hier dus een belangrijke meerwaarde kunnen bieden. Tot slot waren er 5 controlestalen met een morfologisch beeld suggestief voor MDS (na uitsluiten van secundaire oorzaken), in deze subgroep werd een lagere specificiteit van 60% waargenomen (Tabel 7).

Tabel 7. Controlepopulatie met vs. zonder morfologische dysplasie, resultaten Ogata-score.

		Ogata-score					Positieve gevallen	Specificiteit
		- 0	1	+ 2	3	4		
Morfologie +	Diagnose -							
		1	2	2	0	0	2/5	60%
Morfologie ±	Diagnose -							
		5	8	0	0	0	0/13	100%
Morfologie -	Diagnose -							
		35	19	3	1	0	4/58	93%

Morfologie+: morfologisch beeld kan, na uitsluiten van secundaire oorzaken, passen bij MDS;

Morfologie±: morfologisch beeld niet conclusief: randsignificante dysplasie, beginnende MDS niet uit te sluiten, niet-representatief (celarm, perifeer bijgemengd)

Morfologie-: morfologisch beeld bij voorkeur reactief

Diagnose-: uiteindelijke diagnose van behandelde arts op basis van cytomorfologie, cytogenetica, kliniek en uitsluiten van andere oorzaken is geen MDS.

I.4 Financiële impact

Geen meerkost. De Ogata-score kan berekend worden op basis van de LST buis die ingezet wordt bij elk eerste beenmerg van een nieuwe patiënt.

VRAAG 2. KAN EEN EXTENDED OGATA-SCORE EEN MEERWAARDE BETEKENEN IN DE ROUTINEDIAGNOSTIEK VAN MDS IN AZ SINT-JAN, ZONDER MEERKOST?

2.1 Patiënten

Cfr. patiëntenstalen gebruikt voor de studie van de klassieke Ogata-score (1.1 Patiënten).

2.2 Methode

In een studie van Ogata *et al.* werd de meerwaarde van het toevoegen van volgende parameters aan de Ogata-score onderzocht: CD11b ($\geq 10\%$), CD15 ($\geq 20\%$) en CD56 ($\geq 10\%$) expressie op de myeloblasten. De expressie van deze merkers zou ontregeld zijn bij MDS myeloblasten; CD11b en CD15 zijn mature merkers en CD56 is een zogenaamde “lineage infidelity” merker, wat betekent dat de cel een oppervlaktemerker van een andere cellijn tot expressie brengt. Voor elk van de merkers waarvan de cut-off overschreden werd, werd een extra punt toegekend aan de klassieke Ogata-score. Net zoals bij de klassieke Ogata-score werd een score van ≥ 2 als positief beschouwd (1,5). De studie werd uitgevoerd in twee laboratoria en aldus opgedeeld in twee cohortes. De specificiteit bleef quasi onveranderd door het toevoegen van deze extra parameters (onveranderd 98% voor cohorte 1; van 92% naar 90% voor cohorte 2), maar de sensitiviteit werd verhoogd van 44% naar 72% (cohorte 1) en van 71% naar 86% (cohorte 2) voor laag-risico MDS (enkel laag-risico MDS patiënten werden geïncludeerd in de studie) (5).

Door de groep van GFM en GEIL werd de meerwaarde onderzocht van het toevoegen van CD5 en CD7 expressie op de myeloblasten en CD56 expressie op de monocytten aan de Ogata-score. Deze parameters werden geselecteerd uit de merkers die volgens de ELN werkgroep onderzocht zouden moeten worden voor de diagnose van MDS. Het betreft lineage infidelity merkers (1). Bij deze extended Ogata-score werd de totaalscore op 5 punten berekend; als de cut-off ($\geq 30\%$) van een of meer van de extra parameters overschreden werd, dan werd 1 punt toegevoegd aan het totaal van de klassieke Ogata-score. Net zoals bij de klassieke Ogata-score werd een score van ≥ 2 als positief beschouwd (7). Uit de studie van GFM en GEIL bleek dat de CD5 expressie weinig informatief was, maar als CD56 of CD7 toegevoegd werden, werd de sensitiviteit verhoogd van 54% naar 66% voor laag-risico MDS, van 68% (refractaire anemie met excès aan blasten, RAEB-1) en 84% (RAEB-2) naar 97% voor RAEB-1/2 MDS en van 72% naar 89% voor MDS/MPN, de specificiteit bleef quasi onveranderd (van 89% naar 87%) (7).

In de LST buis van AZ Sint-Jan zijn de merkers CD5 en CD56 aanwezig. Op basis van de bevindingen in de literatuur werd door ons in een retrospectieve studie onderzocht of het een meerwaarde zou betekenen om de CD56 expressie op myeloblasten (cfr. Ogata) en de CD56 expressie op monocytten (cfr. GFM en GEIL) op te nemen in een extended Ogata-score. De CD5 expressie op myeloblasten werd niet onderzocht vermits deze merker gekoppeld is aan hetzelfde fluorochroom (PerCP-Cy5.5) als CD34 in de LST buis van AZ Sint-Jan, een onderscheid tussen beide merkers kan dus niet gemaakt worden op de myeloblasten. Bovendien zou het toevoegen van deze parameter geen meerwaarde betekenen (cfr. GFM en GEIL).

De celpopulaties werden gedefinieerd zoals hierboven beschreven (1.2 Methode). Er werd aan het sjabloon een CD56/CD34 plot toegevoegd waarin de myeloblasten en monocytten weergegeven werden (Bijlage 5).

De score werd berekend op een maximum van 5 punten; als de cut-off voor CD56 expressie op myeloblasten ($\geq 10\%$) en/of monocytten ($\geq 30\%$) overschreden werd, werd maximum 1 punt extra toegekend ten opzichte van de klassieke Ogata-score (Bijlage 5).

2.3 Resultaten

2.3.1 Sensitiviteit

De gevoeligheid van de extended Ogata-score werd op dezelfde populatie bepaald als de klassieke Ogata-score ($n=43$) van patiënten bij wie als definitieve diagnose laag-risico MDS, hoog-risico MDS, AML-MDS en CMML gesteld werd. De resultaten van deze analyse worden weergegeven in Tabel 8.

Tabel 8. Resultaten extended Ogata-score.

Ogata-score									
	- 0	1	+ 2	3	4	5	Positieve gevallen	Sensitiviteit	Specificiteit
1. MDS (n=32)									
Totaal							25/32	78%	
Laag-risico (n= 22)							15/22	68%	
SLD	0	0	2	2	0	0	4/4	100%	
MLD	0	5	1	3	4	0	8/13	62%	
RS-SLD	0	0	0	1	0	0	1/1	100%	
RS-MLD	0	1	0	0	0	0	0/1	0%	
5q-	0	1	0	1	1	0	2/3	67%	
Hoog-risico (n=10)							10/10	100%	
EB-1	0	0	1	1	2	0	4/4	100%	
EB-2	0	0	1	1	2	2	6/6	100%	
2. AML-MDS (n=5)									
	0	0	1	3	0	1	5/5	100%	
3. CMML (n=6)									
	0	0	5	0	1	0	6/6	100%	
4. CONTROLE (n=76)									
Totaal							35/76		54%
Anemie bij chronische ziekte	0	3	2	0	0	0			60%
Renale anemie	0	3	4	0	1	0			38%
Leverpathologie	0	2	3	0	0	0			40%
Ijzerdeficiëntie	0	2	1	1	0	0			50%
Vitamine B ₁₂ /FZ deficiëntie	0	1	0	0	0	0			100%
Iatrogene anemie	0	1	1	0	0	0			50%
AIHA	0	1	0	0	0	0			100%
ITP	0	12	2	0	0	0			86%
Immuunpancytopenie	0	0	0	1	0	0			0%
Reactieve cytopenie (toxisch/infecties)	0	0	4	2	0	0			0%
Idiopathische cytopenie	0	14	6	1	0	0			67%
Cytopenie door beenmerginvasie	0	2	6	0	0	0			25%

a. Laag-risico MDS

Voor de extended Ogata-score werd een hogere gevoeligheid (68%) waargenomen dan voor de klassieke Ogata-score (55%) bij laag-risico MDS. Maar ook hier blijft de gevoeligheid te laag om MDS te kunnen uitsluiten bij een

negatieve score. Er zijn onvoldoende stalen aanwezig om belangrijke besluiten te trekken over de performantiekarakteristieken binnen elk subtype (Tabel 8).

Bij 3 stalen van patiënten met laag-risico MDS werd de extended Ogata-score positief (score 2/4) bevonden in overeenstemming met de uiteindelijke diagnose, in tegenstelling tot de klassieke Ogata-score bij deze patiënten (score 1/4).

Ook voor de extended Ogata-score werd steeds een lage gevoeligheid gevonden, onafhankelijk de aan- of afwezigheid van klassieke diagnostische merkers (RS, del(5q) of andere chromosomale afwijkingen geassocieerd met MDS volgens de WHO-classificatie) (Tabel 9).

Tabel 9. Laag-risico MDS met vs. zonder klassieke diagnostische merkers*, resultaten extended Ogata-score.

Ogata-score							Positieve gevallen	Sensitiviteit
-	0	1	+	2	3	4		
	0	1	2	3	4	5		
MDS met klassieke diagnostische merker								
	1	3	2	5	2	0	9/13	69%
MDS zonder klassieke diagnostische merker								
	0	3	1	3	2	0	6/9	67%

*RS, del(5q) of andere chromosomale afwijkingen geassocieerd met MDS volgens de WHO-classificatie

Bij patiënten van wie het beenmerg morfologisch duidelijk suggestief was voor MDS werd slechts een lage sensitiviteit van 56% waargenomen voor de Ogata-score. Bij alle patiënten (n=6) van wie het morfologisch beeld twijfelachtig was voor MDS, werd daarentegen een positieve extended Ogata-score gevonden (sensitiviteit 100%). Bij 3 patiënten hiervan werden eveneens klassieke diagnostische merkers gevonden waardoor de diagnose reeds gesteld kon worden. Bij 3 patiënten werden naast het twijfelachtig morfologisch beeld ook geen klassieke diagnostische merkers gevonden en zou de positieve Ogata-score eventueel een belangrijke suggestie kunnen zijn voor de diagnose van MDS (Tabel 10).

Tabel 10. Laag-risico MDS met vs. zonder morfologische dysplasie, resultaten extended Ogata-score.

Ogata-score							Positieve gevallen	Sensitiviteit
-	0	1	+	2	3	4		
	0	1	2	3	4	5		
Morfologie + Diagnose +								
	1 ¹	6 ²	1 ³	4 ⁵	4 ⁷	0	9/16	56%
Morfologie ± Diagnose +								
	0	0	2 ⁴	4 ⁶	0	0	6/6	100%
Morfologie - Diagnose +								
	0	0	0	0	0	0	0/0	/

Morfologie+: morfologisch beeld kan, na uitsluiten van secundaire oorzaken, passen bij MDS;

Morfologie±: morfologisch beeld niet conclusief: randsignificante dysplasie, beginnende MDS niet uit te sluiten, niet-representatief (celarm, perifeer bijgemengd)

Morfologie-: morfologisch beeld bij voorkeur reactief

Diagnose+: uiteindelijke diagnose van behandelde arts op basis van cytomorfologie, cytogenetica, kliniek en uitsluiten van andere oorzaken is MDS.

¹1 patiënt met del(5q)

²3 patiënten zonder klassieke diagnostische merkers – 1 patiënt met RS, 2 met afwijkend karyotype

³1 patiënt met afwijkend karyotype

⁴1 patiënt zonder klassieke diagnostische merkers – 1 patiënt met afwijkend karyotype

⁵1 patiënt zonder klassieke diagnostische merkers – 1 patiënt met RS, 1 met del(5q), 1 met afwijkend karyotype

⁶2 patiënten zonder klassieke diagnostische merkers – 2 patiënten met afwijkend karyotype

⁷2 patiënten zonder klassieke diagnostische merkers – 1 patiënt met del(5q), 1 met afwijkend karyotype

b. Hoog-risico MDS

Bij alle 10 de stalen van patiënten met hoog-risico MDS werd een correcte diagnose weerhouden op basis van de extended Ogata-score (gevoeligheid 100%). Dit is relatief hoger dan de gevoeligheid van de klassieke Ogata-score (80%). Net zoals bij de klassieke Ogata-score werd ook een hogere gevoeligheid gevonden voor hoog-risico MDS dan voor laag-risico MDS. Maar ook hier geldt dat de morfologische beoordeling steeds suggestief was voor MDS en de positieve Ogata-score dus geen belangrijke meerwaarde zou kunnen betekend hebben (Tabel 8).

c. AML-MDS

De gevoeligheid van de extended Ogata-score voor AML-MDS is 100%, net zoals voor hoog-risico MDS. Dit is relatief hoger dan de gevoeligheid van de klassieke Ogata-score (80%). Ook bij deze groep was het morfologisch beeld echter steeds suggestief voor AML-MDS en had de Ogata-score dus geen belangrijke meerwaarde kunnen betekenen ten opzichte van de morfologische beoordeling (Tabel 8).

d. CMML

De gevoeligheid voor het gebruik van de extended Ogata-score (100%) bij CMML is duidelijk hoger dan bij de klassieke Ogata-score (17%) (Tabel 8). Deze verhoogde gevoeligheid is te wijten aan beide extra parameters: bij 5 stalen werd zowel positiviteit voor CD56 op de myeloblasten als op de monocytën waargenomen. Bij 1 staal was er enkel positiviteit voor CD56 op de monocytën, maar bij dit staal was ook de klassieke Ogata-score reeds positief.

2.3.2 Specificiteit

De specificiteit van de extended Ogata-score werd bepaald op dezelfde populatie (n=76) als de klassieke Ogata-score van patiënten bij wie er vraag was naar MDS op basis van de kliniek en patiënten met onverklaarde perifere cytopeniën, maar bij wie de definitieve diagnose geen MDS was. De resultaten van deze analyse worden weergegeven in Tabel 8.

Voor de extended Ogata-score werd een duidelijk lagere specificiteit (54%) waargenomen dan voor de klassieke Ogata-score (92%). MDS mag dus niet vermoed worden op basis van een positieve extended Ogata-score omwille van de vele vals positieve resultaten. Er werden onvoldoende controlestalen geïncludeerd per categorie om belangrijke besluiten te trekken over de performantiekarakteristieken van de extended Ogata-score binnen elk subtype. Bij 29 controlestalen werd de extended Ogata-score foutief positief (score 2/4), in tegenstelling tot de klassieke Ogata-score bij deze patiënten (score 1/4).

Bij de meerderheid van de controlestalen met een twijfelachtig morfologisch beeld (specificiteit 38%) of zelfs een beeld suggestief voor MDS (na uitsluiten van secundaire oorzaken) (specificiteit 20%), werd foutief een positieve extended Ogata-score en bijgevolg een lage specificiteit waargenomen (Tabel 11).

Tabel 11. Controlepopulatie met vs. zonder morfologische dysplasie, resultaten extended Ogata-score.

		Ogata-score						Positieve gevallen	Specificiteit
		- 0	1	+ 2	3	4	5		
Morfologie +	Diagnose -								
		0	1	2	2	0	0	4/5	20%
Morfologie ±	Diagnose -								
		0	5	8	0	0	0	8/13	38%
Morfologie -	Diagnose -								
		0	35	19	3	1	0	23/58	60%

Morfologie+: morfologisch beeld kan, na uitsluiten van secundaire oorzaken, passen bij MDS;

Morfologie±: morfologisch beeld niet conclusief: randsignificante dysplasie, beginnende MDS niet uit te sluiten, niet-representatief (celarm, perifeer bijgemengd)

Morfologie-: morfologisch beeld bij voorkeur reactief

Diagnose-: uiteindelijke diagnose van behandelde arts op basis van cytomorfologie, cytogenetica, kliniek en uitsluiten van andere oorzaken is geen MDS.

Op enkele gevallen na werd zowel de CD56 expressie op de myeloblasten als op de monocysten altijd positief bevonden. Dit werd gezien bij alle categorieën, ook de controlestalen. Op basis van het derde deel van deze CAT werd echter duidelijk dat dit in de meeste gevallen vermoedelijk een vals positieve reactie betrof (cfr. 3.3.1 Resultaten). In de LST zijn zowel CD56 als kappa gekoppeld aan het fluorochroom PE en de aanwezigheid van kappa aan eenzelfde fluorochroom lijkt een aspecifieke reactie te veroorzaken op zowel de monocysten als de myeloblasten. Op basis van de LST die gebruikt wordt in AZ Sint-Jan kan dus geen onderscheid gemaakt worden tussen vals positieve en terecht positieve CD56 expressie. De extended Ogata-score op basis van de LST kan dan ook geen meerwaarde betekenen in AZ Sint-Jan.

2.4 Financiële impact

Geen meerkost. Deze extended Ogata-score zou net als de klassieke Ogata-score geen meerkost betekenen vermits de extra merker (CD56) voor deze score eveneens sowieso ingezet wordt in de LST buis bij elk eerste beenmerg van een nieuwe patiënt.

VRAAG 3. KAN EEN SPECIFIEK MDS PANEL VOOR FLOWCYTOMETRIE EEN MEERWAARDE BETEKENEN IN DE ROUTINEDIAGNOSTIEK VAN MDS IN AZ SINT-JAN? WAT IS DE MEERKOST?

In het derde deel van deze CAT werd onderzocht of FC analyse met een nieuw panel specifiek voor MDS, gebaseerd op literatuuronderzoek en consensusrichtlijnen, een meerwaarde zou betekenen ten opzichte van de klassieke Ogata-score, gemeten op de LST buis.

3.1 Patiënten

De studie werd prospectief uitgevoerd op beenmergstalen (n=8) afgenomen bij patiënten zonder voorgeschiedenis van (hematologische) maligniteiten bij wie er op basis van de kliniek vraag was naar diagnose/uitsluiten van MDS en patiënten met onverklaarde perifere cytopenie(ën). Er werd beoogd om 5 stalen te includeren van patiënten bij wie MDS als definitieve diagnose gesteld werd, en 5 stalen van patiënten bij wie de definitieve diagnose niet MDS was. Uiteindelijk werden tijdens de duur van de studie 4 stalen van MDS patiënten weerhouden die aan de criteria voldeden en 4 stalen van patiënten bij wie de vermoedelijke diagnose niet MDS is. Bij de negatieve stalen waren de respectievelijke diagnoses: AML (FAB type M1); toxisch/post-inflammatoir; infectieus; nog geen definitieve diagnose maar bij voorkeur geen MDS op basis van cytomorfologie, cytogenetica, moleculair onderzoek en kliniek (verdere opvolging van de patiënt is echter nodig om MDS definitief uit te sluiten).

3.2 Methode

In de literatuur worden heel wat merkers aangehaald die een meerwaarde zouden kunnen betekenen in de diagnose van MDS. De extended Ogata-score die hierboven bestudeerd werd, was gebaseerd op bevindingen van de groep van Ogata *et al.* en de groepen van GFM en GEIL. In het onderzoek van deze groepen werd ook de meerwaarde van andere merkers aangetoond die niet aanwezig zijn in de LST buis die standaard ingezet wordt bij een nieuwe diagnose in AZ Sint-Jan. Meer bepaald zou, zoals hierboven beschreven (2.2 Methode, extended Ogata-score), het toevoegen van volgende parameters aan de Ogata-score een meerwaarde betekenen: CD7 ($\geq 30\%$), CD11b ($\geq 10\%$) en CD15 ($\geq 20\%$) expressie op de myeloblasten en CD56 expressie ($\geq 30\%$) op de monocytten. Deze parameters werden geselecteerd op basis van de frequentie waarmee een aberrante expressie ervan waargenomen wordt en het gemak van discriminatie tussen positieve en negatieve cellen (1,5,7).

Ook in de consensus van de ELN werkgroep over de minimale merkers die nodig zijn voor een correcte diagnose van MDS werden deze merkers opgenomen. Het betreft zogenaamde lineage infidelity merkers (CD5/CD7/CD56 op myeloblasten en CD56 op monocytten) en aberrante aanwezigheid van mature merkers op myeloblasten (CD11b/CD15) (Bijlage 2) (1).

In een studie van Xu *et al.* werd bevestigd dat CD11b/CD15/CD56 frequent een aberrante expressie vertonen op de myeloblasten bij laag-risico MDS (9).

Onder 1.2 Methode (klassieke Ogata-score) werd beschreven dat de CD10- granulocytenfractie gebruikt werd in de studie van Ogata *et al.* om de invloed van perifeer bloed bijmenging te beperken (5). In onze studie van de Ogata-score werden zowel de CD10+ als CD10- granulocyten gebruikt vermits deze monoklonale antistof niet aanwezig is in de LST buis van AZ Sint-Jan.

Ook in de studie van de groepen GFM en GEIL en in een studie van Heron *et al.* werd CD10 toegevoegd. Hier werd de merker echter gebruikt om de lymfoblasten (CD34+CD19+CD10+) en de myeloblasten (CD34+CD19-CD10-) te definiëren (7,12).

Op basis van deze bevindingen in de literatuur werd een nieuwe combinatie van antilichamen specifiek voor de diagnose van MDS samengesteld, bestaande uit één acht kleuren-buis (Tabel 12). Er werd getracht zoveel mogelijk gebruik te maken van monoklonale antistoffen gekoppeld aan dezelfde fluorochromen als deze in de studies waarop dit panel gebaseerd is. Dit lukte voor de meerderheid van de extra merkers, behalve voor CD10 (FITC of PE in publicaties) en CD11b (PE in publicaties) (5,7).

In de studies van Ogata *et al.* en de groepen van GFM en GEIL werd opgenomen boven welke cut-off de respectievelijke merkers als positief dienen beschouwd te worden, maar de merkers zijn niet samen opgenomen in een scoresysteem. Of de positiviteit van de merkers in dit nieuw MDS panel bij een bepaalde patiënt al dan niet suggestief is voor MDS berust dus op de subjectieve beoordeling van de analist.

Tabel 12. Voorstel antilichaampanel voor MDS-diagnostiek.

Fluorochroom	Antilichaam
HV450	CD7*
HV500	CD45
FITC	CD15
PE	CD56
PerCP-Cy5.5	CD34
PE-Cy7	CD19
APC	CD11b
APC-H7	CD10

*CD7 gekoppeld aan HV450 is niet beschikbaar in AZ Sint-Jan. Vermits de aankoop enkel voor het kort onderzoek dat hier beoogd werd (10 stalen) een grote kost zou betekenen, werd geopteerd om voor dit onderzoek CD7 gekoppeld aan APC toe te voegen in een afzonderlijke buis (met verder CD19/CD34/CD45 zodat de celpopulaties gedefinieerd kunnen worden). Indien uit dit onderzoek zou blijken dat het MDS panel een meerwaarde betekent, kan in een uitgebreide validatie CD7 gekoppeld aan HV450 aangekocht worden.

3.3 Resultaten

3.3.1 (Extended) Ogata-score met gating op basis van CD10 voor granulocyten en blasten

Aan het nieuw MDS panel werd CD10 toegevoegd om de centrale neutrofielen (CD10-) te onderscheiden van perifere neutrofielen (CD10+) en myeloblasten (CD10-) en lymfoblasten (CD10+) beter te definiëren. Indien de **Ogata-score** berekend werd op basis van de populaties die zo gedefinieerd werden, werd echter geen verschil waargenomen ten opzichte van de score die berekend werd op basis van de LST waaraan geen CD10 toegevoegd is. Er waren echter geen stalen met belangrijke perifeer bloedbijmenging aanwezig in deze studie, er kan dus geen belangrijk besluit getrokken worden over het elimineren van de invloed van perifeer bloedbijmenging op basis van CD10. Ook het onderscheiden van myeloblasten en lymfoblasten bij de gating werd niet als eenvoudiger ervaren op basis van CD10.

Er bleek echter wel een belangrijk verschil te zijn tussen de **extended Ogata-score** die berekend werd op basis van dit nieuw panel en op basis van de LST. In de LST zijn zowel CD56 als kappa gekoppeld aan het fluorochroom PE, in tegenstelling tot het nieuw panel waar enkel CD56 gekoppeld is aan het fluorochroom PE. De aanwezigheid van kappa aan eenzelfde fluorochroom lijkt echter een specifieke reactie te veroorzaken op

zowel de myeloblasten als de monocytten. Op alle geïncubeerde stalen bij de studie van het nieuw panel (8/8) werd de CD56 expressie op zowel myeloblasten als monocytten positief beschouwd op basis van de LST. Daarentegen werd de CD56 expressie slechts in twee stalen positief beschouwd op de myeloblasten en in twee stalen op de monocytten wanneer de analyse uitgevoerd werd met het nieuw panel (Tabel 13).

CD56 lijkt echter ook op basis van dit nieuw MDS panel geen goede merker om MDS gevallen te onderscheiden van andere aandoeningen. Aberrante expressie van CD56 op de myeloblasten en monocytten werd in het nieuw panel nog waargenomen in een staal van een patiënt waarbij AML (FAB type M1) als diagnose werd gesteld (Tabel 13, GEEN MDS, staal 1); aberrante expressie van CD56 op de monocytten in een staal van een patiënt bij wie de perifere cytopenie verklaard werd door een toxisch/post-inflammatoir ziektebeeld (Tabel 13, GEEN MDS, staal 2).

Tabel 13. Verschil in beoordeling van CD56 expressie op monocytten/myeloblasten op basis van LST (CD56 en kappa allebei gekoppeld aan het fluorochroom PE) en op basis van nieuw panel (enkel CD56 gekoppeld aan fluorochroom PE) (n=8 stalen) (0=expressie lager dan cut-off; 1=expressie hoger of gelijk aan cut-off).

		LST		Nieuw MDS panel	
		CD56 myeloblasten ≥10%	CD56 monocytten ≥30%	CD56 myeloblasten ≥10%	CD56 monocytten ≥30%
Diagnose MDS	Staal 1	1	1	0	1
	Staal 2	1	1	0	0
	Staal 3	1	1	0	0
	Staal 4	1	1	0	0
Diagnose GEEN MDS	Staal 1	1	1	1	1
	Staal 2	1	1	1	0
	Staal 3	1	1	0	0
	Staal 4	1	1	0	0

2

3.3.2 Merkers nieuw MDS panel

Bij het onderzoek naar de meerwaarde van de specifieke MDS-merkers in het nieuw MDS panel, werd slechts in 1 staal van een patiënt met MDS positiviteit waargenomen voor enkele van de merkers: CD15 op de myeloblasten en CD56 op de monocytten (Tabel 14, MDS, staal 1).

Een aberrante expressie van CD56 op de myeloblasten en monocytten werd waargenomen bij een patiënt met AML (FAB type M1) (Tabel 14, GEEN MDS, staal 1) en van CD11b/CD15/CD56 op de myeloblasten bij een patiënt met een toxisch/post-inflammatoir ziektebeeld (Tabel 14, GEEN MDS, staal 2). De merkers die toegevoegd werden in het nieuw MDS panel lijken op basis van deze beperkte validatie dus geen meerwaarde in het onderscheiden van patiënten met en zonder MDS.

Zowel met als zonder het definiëren van granulocyten/myeloblasten/lymfoblasten op basis van CD10 (cfr. supra) werd hetzelfde resultaat waargenomen voor de merkers in het nieuw MDS panel.

Tabel 14. Resultaten merkerexpressie nieuw MDS panel (0=expressie lager dan cut-off; 1=expressie hoger of gelijk aan cut-off).

Nieuw MDS panel						
		CD7 myeloblasten ≥30%	CD11b myeloblasten ≥10%	CD15 myeloblasten ≥20%	CD56 myeloblasten ≥10%	CD56 monocyten ≥30%
Diagnose MDS	Staal 1	0	0	1	0	1
	Staal 2	0	0	0	0	0
	Staal 3	0	0	0	0	0
	Staal 4	0	0	0	0	0
Diagnose GEEN MDS	Staal 1	0	0	0	1	1
	Staal 2	0	1	1	1	0
	Staal 3	0	0	0	0	0
	Staal 4	0	0	0	0	0

?

3.4 Financiële impact

Bij elk eerste beenmerg van een nieuwe patiënt wordt de LST buis (12 merkers) voor FC analyse ingezet in AZ Sint-Jan. Indien daarenboven het nieuw MDS panel ingezet zou worden bij patiënten met een beeld dat klinisch verdacht is voor MDS (8 merkers), betekent dit een extra kost die aangerekend wordt aan het RIZIV.

Vijf lymfocyttaire merkers van de LST buis kunnen vergoed worden volgens de nomenclatuurnummers 555693 – 555704 (B200), één merker volgens de nomenclatuurnummers 555730 – 555741 (B500), en de overige zes tot slot volgens de nomenclatuurnummers 556474 – 556485 (B400). Volgens de huidige B-waarde (€0,030868) betekent dit een vergoeding door het RIZIV van €120,39 voor de LST volgens deze simulatie.

De kost voor een FC analyse met het nieuw MDS panel (enkel gebaseerd op de kost van de monoklonale antistoffen en 15 minuten MLT arbeidstijd) wordt geraamd op €36,09. Bij deze simulatie werden echter belangrijke kosten buiten beschouwing gelaten zoals deze van de tijd die gespendeerd wordt door een expert voor de interpretatie van de resultaten.

Onder 555693 – 555704 (B200) kunnen maximum 5 lymfocyttaire merkers aangerekend worden, onder 555730 – 555741 (B500) de identificatie van maximum 1 antigen en onder 556474 – 556485 (B400) de identificatie van maximum 12 antigenen. Concreet betekent dit dat, naast de vergoeding voor de LST buis zoals voorgesteld in deze simulatie, nog 6 extra merkers vergoed kunnen worden door het RIZIV aan een B400 waarde voor het nieuw MDS panel. Dit komt neer op een extra vergoeding door het RIZIV van €74,08. Deze meerkost aan het RIZIV kan enkel verantwoord worden indien het nieuw panel een meerwaarde betekent (15).

DISCUSSIE – FLOWCYTOMETRISCHE SCORES BIJ MDS: EEN MEERWAARDE ZONDER MEERKOST?

De diagnose van MDS is niet altijd eenduidig wanneer geen objectieve merkers, zijnde een verhoogd aantal blasten en/of ringsideroblasten en/of kenmerkende chromosomale afwijkingen, gedetecteerd worden. Vooral in deze groep van laag-risico MDS patiënten zou FC analyse mogelijk een meerwaarde kunnen betekenen. De FC analyse bij MDS is meestal gebaseerd op uitgebreide antilichaampanelen waarmee afwijkingen in de maturatiepatronen en aberrante merkerexpressie opgespoord worden. Door de hoge kostprijs van deze panelen en de uitgebreide expertise die nodig is voor de interpretatie van de resultaten, wordt FC analyse in de routinediagnostiek van MDS echter weinig toegepast. Met het oog op een vereenvoudiging van het onderzoek naar MDS werd de Ogata-score ontwikkeld (5).

In deze CAT werd de meerwaarde de Ogata-score in de routinediagnostiek van MDS onderzocht. De eenvoudige toepasbaarheid van de Ogata-score werd bevestigd: zowel voor de analyse als de interpretatie was geen bijzondere expertise vereist. Een belangrijk voordeel, naast de eenvoud, is dat de Ogata-score zonder extra kost zou kunnen bepaald worden in AZ Sint-Jan. Het scoresysteem is immers gebaseerd op merkers (CD34/CD45) die aanwezig zijn in de LST buis die bij elk eerste beenmergstaal van een patiënt zonder voorgeschiedenis van hematologische aandoening uitgevoerd wordt.

De sensitiviteit van de Ogata-score was eerder laag, vooral bij laag-risico MDS (55%) terwijl de diagnose op basis van de klassieke diagnostische merkers ook net bij deze categorie vaak niet eenduidig is. Dit resultaat lag in de lijn van eerder gepubliceerde studies waarin variabele, maar steeds lage gevoeligheden waargenomen werden bij MDS patiënten zonder een exces aan blasten (44-71%) (5-7). Bij MDS-EB-1/2 lag de Ogata-score hoger (sensitiviteit 80%), wat erop kan wijzen dat de detectie van BM dysplasie met FC toeneemt met de progressie van de ziekte zoals in een studie van de GFM en GEIL groep gerapporteerd werd (sensitiviteit van 54% bij laag-risico MDS, 68% bij RAEB-I en 84% bij RAEB-2) (7). Bij deze categorie was in onze studie het morfologisch beeld echter ook steeds suggestief voor MDS en zou de Ogata-score dus geen belangrijke meerwaarde betekenen. Voor AML-MDS werd eveneens een sensitiviteit van 80% waargenomen, met steeds morfologisch een suggestief beeld. Bij CMML werd een lage sensitiviteit waargenomen (17%) in tegenstelling tot wat verwacht werd op basis van gegevens in een studie van de GFM en GEIL groep waar een sensitiviteit van 72% gevonden werd voor de groep van MDS/MPN overlap syndromen (hoofdzakelijk CMML-patiënten) (7).

De specificiteit (92%) van de Ogata-score was hoog en in overeenstemming met eerdere publicaties waar, in tegenstelling tot de variabele sensitiviteit, steeds een hoge specificiteit waargenomen werd (89-98%) (5-7). Bij controlestalen met een twijfelachtig morfologisch beeld (n=13) werd steeds correct een negatieve Ogata-score waargenomen (specificiteit 100%). Bij controlestalen met een morfologisch beeld dat suggestief was voor MDS (n=5) werd echter een lagere specificiteit van 60% gevonden.

De Ogata-score lijkt op basis van onze bevindingen dus een meerwaarde in de routinediagnostiek, als aanvulling op de morfologische beoordeling en klinische gegevens, om MDS te suggereren bij een positieve score. En dit zonder meerkost.

In het tweede deel van deze CAT werd de meerwaarde van een **extended Ogata-score** onderzocht waarbij twee parameters werden toegevoegd: CD56 expressie op de myeloblasten en op de monocytten. Deze parameters kunnen eveneens bepaald worden op basis van de LST buis die gebruikt wordt in AZ Sint-Jan, de toepassing van de extended Ogata-score zou dus ook geen meerkost met zich meebrengen.

Het discriminerend vermogen van de Ogata-score met toevoeging van CD56 expressie op de myeloblasten en monocytten voor MDS, AML-MDS, CMML en de controlestalen bleek echter laag in onze studie op basis van de LST. Beide merkers werden, op enkele stalen na, altijd allebei positief bevonden, ook bij de controlestalen. Er werd dus een verhoogde sensitiviteit ten opzichte van de klassieke Ogata-score waargenomen in alle categorieën (laag-risico MDS 68%; hoog-risico MDS/MDS-AML/CMML 100%), maar dit ten koste van een sterk verlaagde specificiteit (54%). In eerder gepubliceerde studies waarbij de CD56 expressie op monocytten of myeloblasten als extra parameter toegevoegd werden aan de Ogata-score (weliswaar naast andere extra merkers), werd eveneens een verhoogde sensitiviteit waargenomen maar bleef de specificiteit (quasi) onveranderd (5,7). De afwijkende bevindingen van onze extended Ogata-score ten opzichte van de literatuurgegevens zijn vermoedelijk te wijten zijn aan een vals positieve expressie van CD56 op de myeloblasten en monocytten wanneer de extended Ogata-score bepaald wordt op basis van de LST. In de LST zijn zowel CD56 als kappa gekoppeld aan het fluorochroom PE en de aanwezigheid van kappa aan eenzelfde fluorochroom lijkt een aspecifieke reactie te veroorzaken op zowel de monocytten als de myeloblasten.

Op basis van de LST die gebruikt wordt in AZ Sint-Jan kan dus geen onderscheid gemaakt worden tussen vals positieve en terecht positieve CD56 expressie. De extended Ogata-score op basis van de LST kan dan ook geen meerwaarde betekenen in AZ Sint-Jan.

In het derde deel van deze CAT werd onderzocht of een nieuw **panel specifiek voor MDS**, opgesteld op basis van literatuuronderzoek en consensusrichtlijnen met merkers die binnen de terugbetalingscriteria van het RIZIV vallen, een analytische meerwaarde zou kunnen betekenen (1,5-7,9,12). Dit panel werd samengesteld uit volgende merkers: CD7/CD10/CD11b/CD15/CD19/CD34/CD45/CD56. Slechts bij één van de vier patiënten met MDS werd positiviteit waargenomen voor enkele van de merkers (CD15 op de myeloblasten en CD56 op de monocytten). Aberrante expressie werd waargenomen bij twee van de vier patiënten zonder MDS (CD56 op de myeloblasten en monocytten bij een patiënt met AML; CD11b/CD15/CD56 op de myeloblasten bij een patiënt met een toxisch/post-inflammatoir ziektebeeld). De interpretatie van deze merkers bij de diagnostiek van MDS is niet eenduidig, in tegenstelling tot een scoresysteem.

De merkers die toegevoegd werden in het nieuw MDS panel lijken op basis van deze beperkte studie geen meerwaarde in het onderscheiden van patiënten met en zonder MDS. Het inzetten van een extra panel vergt echter extra werktijd, de interpretatie is niet eenduidig en er worden meer kosten gegenereerd die vergoed moeten worden door het RIZIV. De implementatie van dit panel lijkt dan ook niet verantwoord.

Samengenomen lijkt de berekening van de klassieke Ogata-score op basis van de LST buis een meerwaarde te kunnen betekenen in de diagnose van MDS, zonder meerkost. Het analyseren van bijkomende merkers lijkt in eerste instantie weinig zinvol, al is verdere evaluatie noodzakelijk.

To do/ACTIONS

- 1) Een testcode voor de Ogata-score werd aangemaakt in het LIS-systeem. De implementatie van de Ogata-score in de routinediagnostiek zal ons leren of de meerwaarde die gevonden werd bij de validatie, ook in de praktijk ervaren wordt.
- 2) Het onderzoek naar de meerwaarde van een nieuw MDS panel moet verdergezet worden met het includeren van meer stalen.

BIJLAGE I. WHO-CLASSIFICATIE 2016, MDS SUBTYPES (14)**Table 15. PB and BM findings and cytogenetics of MDS**

Name	Dysplastic lineages	Cytopenias*	Ring sideroblasts as % of marrow erythroid elements	BM and PB blasts	Cytogenetics by conventional karyotype analysis
MDS with single lineage dysplasia (MDS-SLD)	1	1 or 2	<15%/<5%†	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS with multilineage dysplasia (MDS-MLD)	2 or 3	1-3	<15%/<5%†	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS with ring sideroblasts (MDS-RS)					
MDS-RS with single lineage dysplasia (MDS-RS-SLD)	1	1 or 2	≥15%/≥5%†	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS-RS with multilineage dysplasia (MDS-RS-MLD)	2 or 3	1-3	≥15%/≥5%†	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any, unless fulfills all criteria for MDS with isolated del(5q)
MDS with isolated del(5q)	1-3	1-2	None or any	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	del(5q) alone or with 1 additional abnormality except -7 or del(7q)
MDS with excess blasts (MDS-EB)					
MDS-EB-1	0-3	1-3	None or any	BM 5%-9% or PB 2%-4%, no Auer rods	Any
MDS-EB-2	0-3	1-3	None or any	BM 10%-19% or PB 5%-19% or Auer rods	Any
MDS, unclassifiable (MDS-U)					
with 1% blood blasts	1-3	1-3	None or any	BM <5%, PB = 1%,‡ no Auer rods	Any
with single lineage dysplasia and pancytopenia	1	3	None or any	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	Any
based on defining cytogenetic abnormality	0	1-3	<15%§	BM <5%, PB <1%, no Auer rods	MDS-defining abnormality
Refractory cytopenia of childhood	1-3	1-3	None	BM <5%, PB <2%	Any

*Cytopenias defined as: hemoglobin, <10 g/dL; platelet count, <100 × 10⁹/L; and absolute neutrophil count, <1.8 × 10⁹/L. Rarely, MDS may present with mild anemia or thrombocytopenia above these levels. PB monocytes must be <1 × 10⁹/L.

†If *SF3B1* mutation is present.

‡One percent PB blasts must be recorded on at least 2 separate occasions.

§Cases with ≥15% ring sideroblasts by definition have significant erythroid dysplasia, and are classified as MDS-RS-SLD.

BIJLAGE II. CONSENSUS ELN, MINIMALE MERKERS VOOR BEPALEN VAN DYSPLASIE MET FLOWYTOMETRIE (I)

Table 1. Recommended minimal requirements to assess dysplasia by flow cytometry

<i>Bone marrow subset</i>	<i>Recommended analyses</i>	<i>Aberrancy</i>
Immature myeloid and monocytic progenitors	Percentage of cells in nucleated cell fraction ^a Expression of CD45 Expression of CD34 Expression of CD117 Expression of HLA-DR Expression of CD13 and CD33 Asynchronous expression of CD11b, CD15 Expression of CD5, CD7, CD19, CD56 ^b	Increased percentage Lack of/decreased/increased Lack of/decreased/increased Homogenous under/overexpression Lack of/increased expression Lack of/decreased/increased Presence of mature markers Presence of lineage infidelity markers
Maturing neutrophils	Percentage of cells as ratio to lymphocytes SSC as ratio vs SSC of lymphocytes Relationship of CD13 and CD11b Relationship of CD13 and CD16 Relationship of CD15 and CD10	Decreased Decreased Altered pattern ^c Altered pattern ^c Altered pattern ^c ; for example, lack of CD10 on mature neutrophils
Monocytes	Percentage of cells Distribution of maturation stages Relationship of HLA-DR and CD11b Relationship of CD36 and CD14 Expression of CD13 and CD33 Expression of CD56 ^b	Decreased/increased Shift towards immature Altered pattern ^c Altered pattern ^c (Homogenous) under/overexpression Presence of lineage infidelity marker
Progenitor B cells	Enumeration as fraction of total CD34+ based on CD45/CD34/SSC in combination with CD10 or CD19	Decreased or absent
Erythroid compartment ^d	Percentage of nucleated erythroid cells Relationship CD71 and CD235a Expression of CD71 Expression of CD36 Percentage of CD117-positive precursors	Increased Altered pattern ^c Decreased Decreased Increased

^aDiscrepancies in counts between several definitions indicate aberrancies. ^bTo be used with caution, as CD56 can be upregulated upon activation, be aware of normal cut-off values (also in stressed marrow). ^cAltered patterns can include altered distribution of maturation stages and/or altered expression levels of indicated antigens. ^dUnder evaluation. Examples of several flow cytometric aberrancies in myelodysplastic syndrome can be found on the European LeukemiaNet website: www.leukemia-net.org.

Bijlage III. EUROFLOW CONSORTIUM, ANTILICHAAMPANEL VOOR DIAGNOSE VAN MDS MET FLOWCYTOMETRIE (10)

Figure 18. Identification of acute myeloid leukemia (AML) blast cells using the EuroFlow AML/myelodysplastic syndrome (MDS) panel backbone markers (CD34, CD117, HLADR and CD45). Automated population separator (APS) (principal component (PC)1 versus PC2) plots of three different AML patients are shown. Color codes are as follows: red dots, AML cells; green dots, mature lymphocytes; purple dots, maturing neutrophils.

Table 14. The EuroFlow AML/MDS antibody panel^{a,b}

Tube	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPy5.5	PECy7	APC	APCH7	Aim
1	HLADR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10	Diagnosis and classification, neutrophilic maturation, PNH
2	HLADR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	CD300e (IREM2)	CD14	Diagnosis and classification, monocytic maturation, PNH
3	HLADR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71	Diagnosis and classification, erythroid maturation
4	HLADR	CD45	NuTdT	CD56	CD34	CD117	CD7	CD19	Aberrant expression of lymphoid markers, abnormal B lymphoid maturation
5	HLADR	CD45	CD15	NG2	CD34	CD117	CD22	CD38	Aberrant marker expression, stem cells
6	HLADR	CD45	CD42a and CD61	CD203c	CD34	CD117	CD123	CD4	Diagnosis and classification of AML
7	HLADR	CD45	CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9	Megakaryocytic, basophilic, and plasmacytoid dendritic cell lineages Characterization of megakaryoblastic leukemia, and systemic mastocytosis

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; APC, allophycocyanin; BB, backbone; BM, bone marrow; Cy7, cyanin7; FITC, fluorescein isothiocyanate; H7, hillite7; MDS, myelodysplastic syndrome; Nu, nuclear; PacB, pacific blue; PacO, pacific orange; PE, phycoerythrin; PerCPy5.5, peridinin-chlorophyll-protein-cyanin5.5; PNH, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. ^aFurther information about markers and hybridomas is provided in the Appendix. ^bA total of 96 BM samples were evaluated for selection of the BB markers. An additional 84 BM AML samples were evaluated with this version (final) of the panel.

In case of MDS suspicion, the first four tubes of the EuroFlow AML/ MDS panel are sufficient to identify abnormalities in the differentiation of the various (major) myeloid lineages (for example, neutrophil, monocytic and erythroid lineages). Tubes 5–7 do not yet seem to provide relevant additional information for MDS diagnosis.

BIJLAGE IV. AZ SINT-JAN, VOORBEELD ANALYSE MET LST BUIS

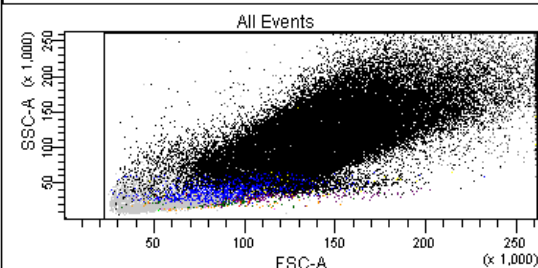
Tube Name: LST-buis
 Record Date: Mar 31, 2016 3:01:39 PM
 CST SETUP STATUS: SUCCESS
 CST BEADS LOT ID: 94851
 CYTOMETER CONFIG NAME: 2015 1 3-laser, 8-color (4-2-2)

Uitvoerder:
 Population

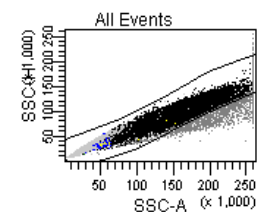
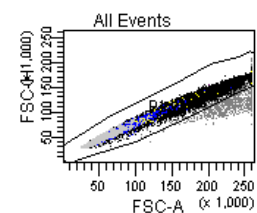
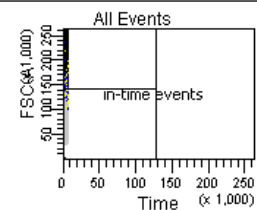
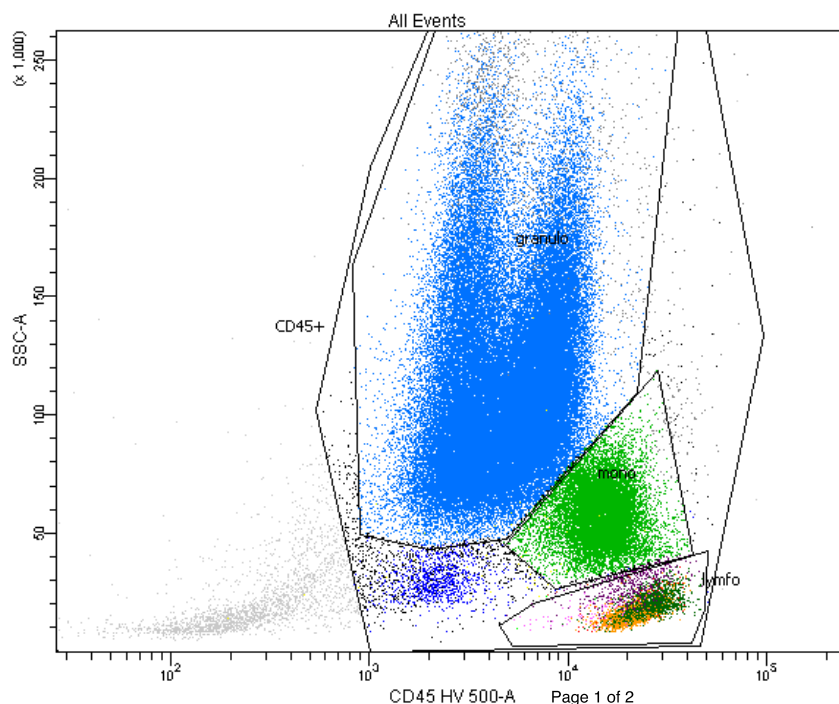
Tube: LST-buis

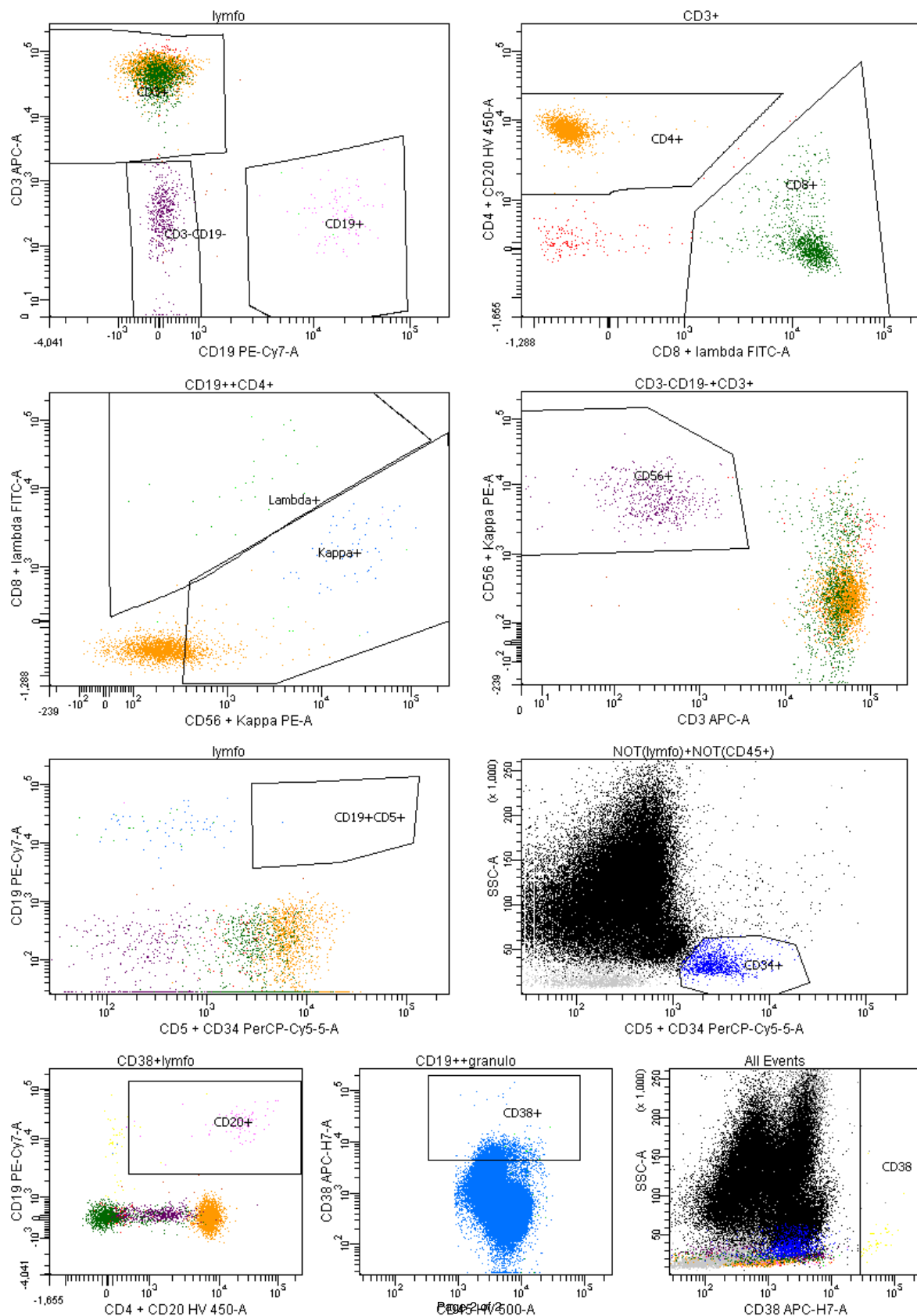
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	98,176	###	100.0
in-time events	98,176	100.0	100.0
P1	96,994	98.8	98.8
P2	96,043	99.0	97.8
Threshold	95,755	99.7	97.5
CD45+	93,669	97.8	95.4
granulo	73,400	78.4	74.8
mono	13,993	14.9	14.3
lymfo	4,209	4.5	4.3
CD3+	3,612	85.8	3.7
CD4+	2,272	62.9	2.3
CD8+	1,173	32.5	1.2
CD4 & CD8	3,445	95.4	3.5
CD19+	94	2.2	0.1
Kappa+	67	71.3	0.1
Lambda+	25	26.6	0.0
CD38+	12	12.8	0.0
Kappa & lam	92	97.9	0.1
CD19+CD5+	1	1.1	0.0
CD5+ en ka	1	1.1	0.0
CD5+ en lan	0	0.0	0.0
CD3-CD19-	496	11.8	0.5
CD56+	493	99.4	0.5
CD20+	91	2.2	0.1
Lymfosom	4,199	99.8	4.3
NOT(lymfo)	89,460	95.5	91.1
CD34+	1,146	1.3	1.2
CD38	50	0.1	0.1

Population	#Events	%Parent	%Grand Parent
CD3+	3,612	86	###
CD4+	2,272	###	54
CD8+	1,173	###	28
CD19+	94	2	###
Kappa+	67	###	2
Lambda+	25	###	1
CD38+	12	###	0
CD19+CD5+	1	###	0
CD56+	493	###	12
CD20+	91	2	###
CD34+	1,146	###	1
NOT(CD45+)	2,086	2	2



Population	%Par...
CD4 & CD8 som	95.4
Kappa & lambda som	97.9
Lymfosom	99.8
NOT(CD45+)	2.2



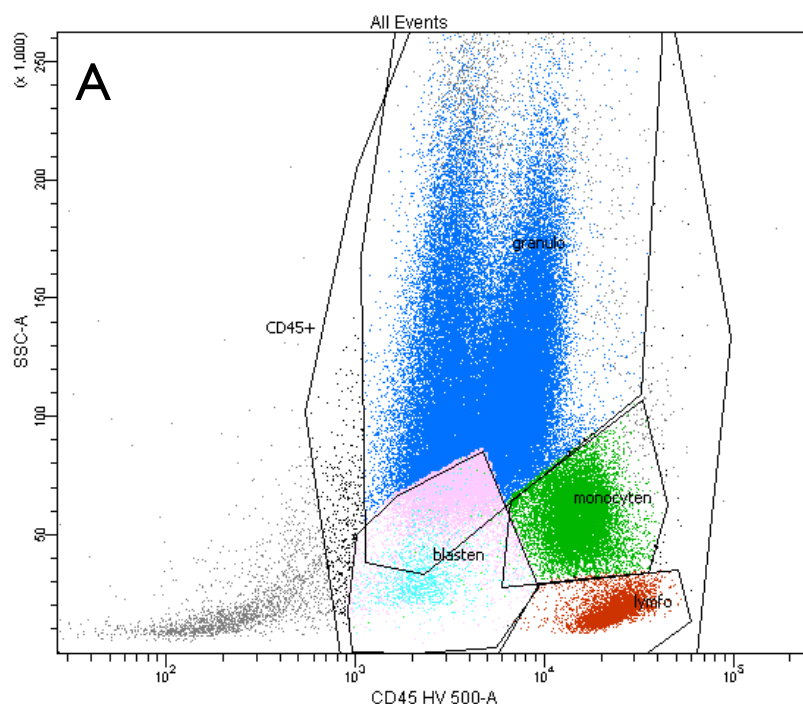
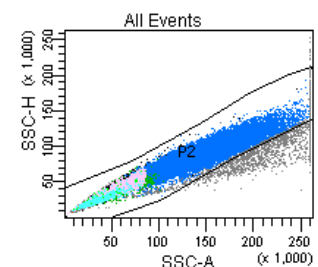
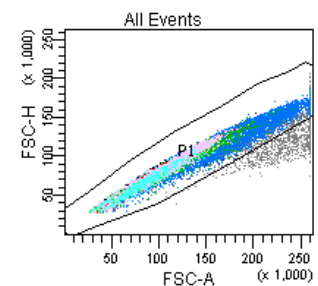
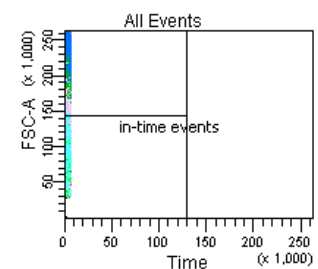
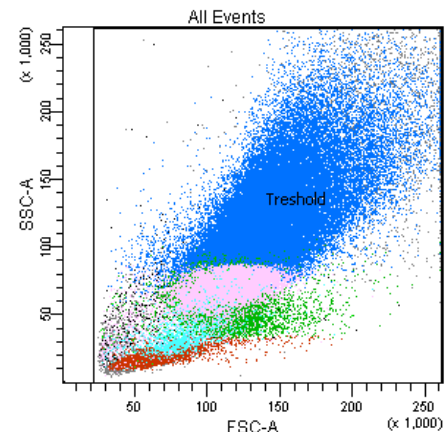


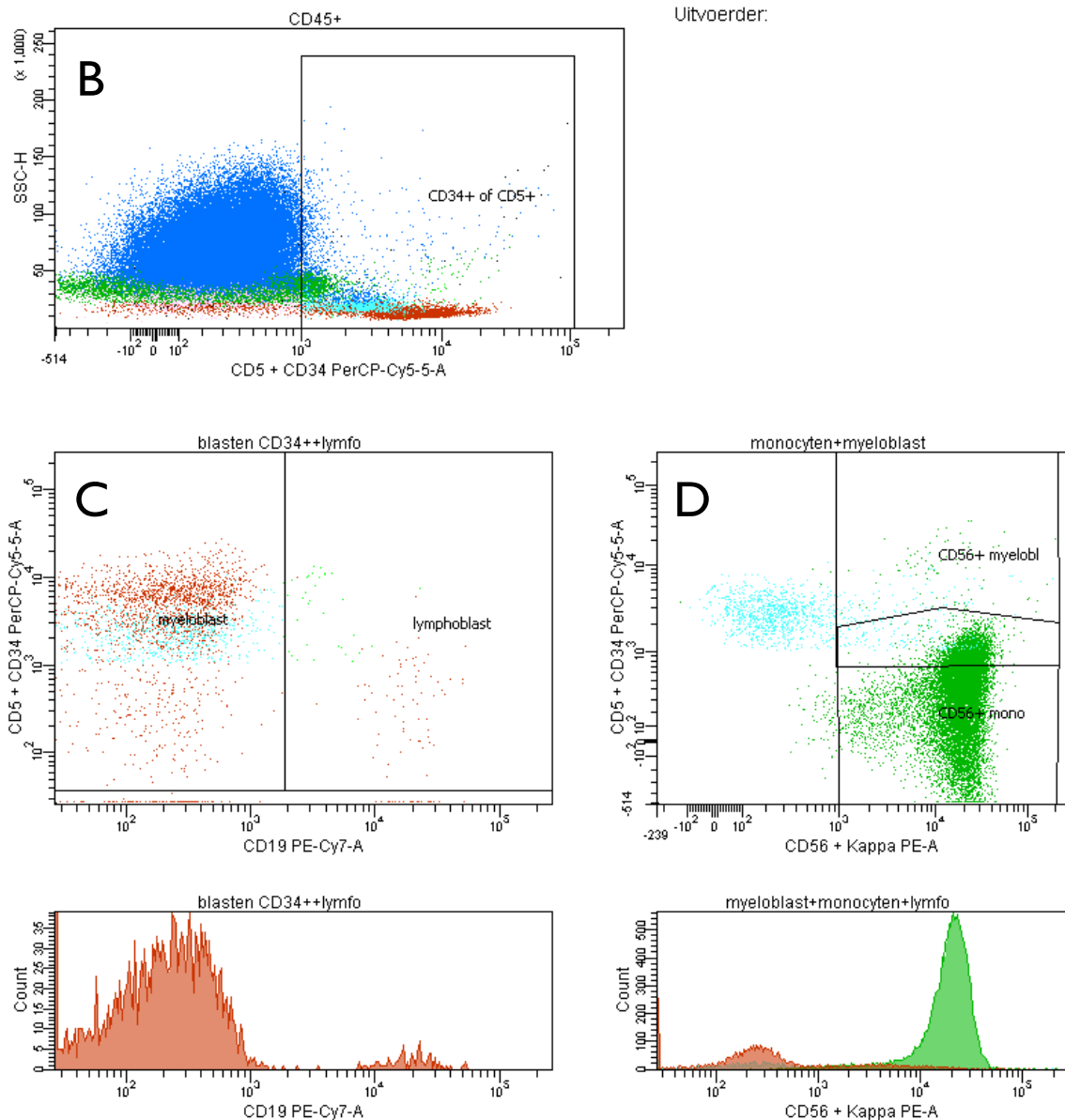
Bijlage V. AZ Sint-Jan, Gatingstrategie en voorbeeld berekening OGATA-score

Population	%Parent	%Grand Parent	SSC-A Median	CD45 HV 500-A Mean
granulo	####	####	106,261	5,605
lymfo	####	####	16,634	23,485
CD56+ mono	99	####	56,308	15,486
myeloblast	####	1	31,320	2,572
CD56+ myelobl	20	####	39,048	3,510
lymphoblast	3	####	43,305	4,719
Controle blasten	100	1	31,517	2,630

Tube: LST-buis

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	98,176	####	100.0
in-time events	98,176	100.0	100.0
P1	96,994	98.8	98.8
P2	96,043	99.0	97.8
Threshold	95,755	99.7	97.5
CD45+	93,772	97.9	95.5
granulo	73,465	78.3	74.8
lymfo	4,158	4.4	4.2
monocyten	14,091	15.0	14.4
CD56+ mono	13,923	98.8	14.2
blasten	11,960	12.8	12.2
CD34+ of CD5+	6,735	7.2	6.9
blasten CD34+	1,221	1.3	1.2
myeloblast	1,189	97.4	1.2
CD56+ myel	239	20.1	0.2
lymphoblast	34	2.8	0.0
Controle blaster	1,221	100.0	1.2





Gatingstrategie

De populatie granulocyten, lymfocyten, monocyten en blasten werden gegate volgens hun ligging op een CD45/SSC plot (A). De gating voor de blasten was voldoende ruim, CD34- events werden op basis van een CD34/SSC plot (B) verwijderd. De populatie CD34+ blasten die op deze manier gedefinieerd was, werd vervolgens op een CD19/CD34 plot (C) weergegeven om de lymfoblasten (CD19+CD34+) van de myeloblasten (CD19-CD34+) te onderscheiden.

Tot slot werden de myeloblasten en monocyten weergegeven in een CD56/CD34 plot (D) voor het bepalen van de extended Ogata-score.

Nota: in de LST buis worden zowel CD34 als CD5 gekoppeld aan het fluorochroom PerCP-Cy5.5 toegevoegd. Op basis van de ligging op de CD45/SSC plot kunnen CD5+ lymfocyttaire cellen en CD34+ blastaire cellen echter onderscheiden worden zodat er geen verwarring ontstaat bij het aflezen van de positieve events in het kanaal met PerCP-Cy5.5. Eenzelfde redenering wordt gevolgd voor CD56 en Kappa, gekoppeld aan het fluorochroom PE. Kappa-expressie wordt waargenomen op klonale B-cellen, die eveneens CD19+ zijn, in tegenstelling tot de CD19- cellen met (aberrante) CD56-expressie (NK-cellen, blasten). Deze methode wordt toegepast om met een 8-kleuren flowcytometer een maximum aan informatie te verkrijgen met één buis.

Berekening Ogata-score

De afzonderlijke parameters voor de Ogata-score werden in het sjabloon gedefinieerd op basis van de aangeduide populaties (gating) en de merkerexpressie. Na berekening door de software werden de parameters weergegeven in tabelvorm (rode omkadering bovenaan sjabloon). Op basis van deze parameters kon de Ogata-score handmatig berekend worden zoals in onderstaande tabel weergegeven voor dit voorbeeld.

FC parameter	Ruwe waarde	Cut-off	Score
1. Myeloblasten op alle CD45+ cellen (%)	1	≥ 2	0
2. Lymfoblasten op alle CD34+ cellen (%)	3	≤ 5	1
3. Ratio MFI lymfocyten over MFI myeloblasten op CD45	23485/2572 = 9,13	≤ 4 of ≥ 7.5	1
4. Ratio SSC granulocyten over SSC lymfocyten	106261/16634 = 6,39	≤ 6	0
Totaal Ogata-score		≥ 2	2/4 → positief voor MDS

Berekening Extended Ogata-score

FC parameter	Ruwe waarde	Cut-off	Score
1. Myeloblasten op alle CD45+ cellen (%)	1	≥ 2	0
2. Lymfoblasten op alle CD34+ cellen (%)	3	≤ 5	1
3. Ratio MFI lymfocyten over MFI myeloblasten op CD45	23485/2572 = 9,13	≤ 4 of ≥ 7.5	1
4. Ratio SSC granulocyten over SSC lymfocyten	106261/16634 = 6,39	≤ 6	0
5. CD56 expressie op myeloblasten	20	≥ 10	1
6. CD56 expressie op monocytten	99	≥ 30	1
Totaal extended Ogata-score		≥ 2	3/5 → positief voor MDS

Hoewel de resultaten voor de twee extra parameters die toegevoegd werden bij de extended Ogata-score allebei boven de cut-off waarde lagen in dit voorbeeld, werd maar 1 extra punt toegekend in vergelijking met de klassieke Ogata-score. De totaalscore voor de extended Ogata-score werd berekend op 5 punten: als minimum een van de twee extra parameters positief was, werd 1 extra punt gegeven.