

CAT
Critically Appraised Topic**Titel: Validatie en implementatie van 8-kleuren flowcytometrie en van de (gemodificeerde) EuroFlow panels op de FacsCanto II (BD Biosciences)**

Author: Pypen Yolande

Supervisor: Dr. V. Peeters, Dr. B. Maes, Dr. A. Hendrickx, Prof. Dr. J.-L. Rummens

Date: 27/03/2012

CLINICAL BOTTOM LINE

Ondanks het wijdverspreid gebruik in de routine van flowcytometrische immunofenotypering voor laboratoriumdiagnostiek van hematologische neoplasieën, zijn er grote verschillen in gebruikte reagentia en in de manier van rapporteren van resultaten tussen de verschillende diagnostische centra, waardoor er hedendaags een gebrek aan uniformiteit van de resultaten is, zowel in België als in Europa. Gezien deze variabiliteit heeft het EuroFlow consortium getracht om deze analytische procedure te innoveren en te standaardiseren met behulp van nieuwe technieken.

Naar aanleiding van deze standaardisatie in de flowcytometrie is er in het Jessa laboratorium besloten om over te schakelen op nieuwe antistofpanels gebruik makend van FACSCanto II (BD Biosciences) met de mogelijkheid tot 8-kleuren flowcytometrie. Gezien enkele beperkingen aan de voorgestelde EuroFlow panels, zoals bijvoorbeeld het ontbreken van sommige markers die gebruikt worden bij de Wereldgezondheidsorganisatie classificatie van tumoren van hematopoïetische en lymfoïede weefsels 2008 (WHO 2008 classificatie), is er besloten om gemodificeerde antistofpanels op te stellen. Er is tevens, zoals voorgesteld door het EuroFlow consortium, overgestapt op het principe van meerfase onderzoek door te starten met een oriënteringsbuis, en enkel indien nodig verder te werken met classificatiebuizen, om zo het aantal gebruikte antistoffen te reduceren. Na grondige literatuurstudie van de in het Jessa laboratorium eerder ongekende markers, blijkt er na de validatie en invoering van de nieuwe mature B-cel neoplasie (B-CLPD) en plasmacel neoplasie/dyscrasie (PCD) antistofpanels voor diagnose en follow-up, een eenvoudige en snelle interpretatie van de resultaten mogelijk. Bij een eerste evaluatie na een periode van 10 weken zijn er voornamelijk voordelen, zo blijkt er een significante reductie van de gebruikte antistoffen, een verkorte hands-on-time tijd op de werkvloer en door meer betrokkenheid van de MLT's een positieve ervaring.

In de nabije toekomst zal men het mature T- en NK-cel neoplasie (T-CLPD en NK-CLPD) antistofpanel en het acute leukemie/myelodysplastisch syndroom (AL/MDS) antistofpanel valideren en invoeren om ook hier meer standaardisering te verkrijgen. Vervolgens is het de bedoeling om de nieuwe INFINICYT software te leren hanteren om op eenvoudige wijze diepgaande data-analyses te kunnen uitvoeren.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Voor de laboratoriumdiagnostiek van hematologische neoplasieën worden verschillende technieken gebruikt waaronder de cytomorfologie, flowcytometrische immunofenotypering, anatoompathologie, moleculaire technieken en genetisch onderzoek. Er zijn 3 peilers waarop men een antwoord tracht te verkrijgen bij de diagnostiek van hematologische neoplasieën, namelijk het vaststellen of bevestigen van de diagnose, het classificeren van de pathologie (mede in kader van prognostische diagnostiek) en het opvolgen en evalueren van een eventuele opgestarte behandeling. Dit laatste tracht men te doen door het opsporen van kleine aantallen van maligne cellen zowel tijdens als na de therapie om zo het succes van de therapie op te kunnen volgen ("Minimal Residual Disease") (MRD). (1-4)

De laatste 20 jaar is er veel aandacht besteed aan de moleculaire diagnostiek en heeft men met meerdere Europese netwerken samengewerkt om hierin een belangrijke mate van standaardisatie en kwaliteitscontrole te bereiken. Er zijn echter nog verschillende nadelen aan het gebruik van moleculaire technieken voor de diagnostiek van hematologische neoplasieën. Moleculaire technieken zijn immers tijdrovend en men kan het momenteel nog niet toepassen voor alle verschillende types hematologische neoplasieën. Tevens moet men eerst een celuitzuivering uitvoeren alvorens men gerichte analyses op een specifieke subpopulatie kan uitvoeren. (1)

Flowcytometrie daarentegen kent deze voornoemde beperkingen niet. Men bereikt snel resultaten, de techniek kan toegepast worden bij de diagnose en eventueel tijdens de follow-up van alle hematologische neoplasieën. Eveneens kan men de verschillende subpopulaties heel nauwkeurig van elkaar onderscheiden, zonder dat deze

subpopulaties moeten uitgezuiverd worden, door het gebruik van antistoffen gericht tegen populatiespecifieke antigenen.

Desalniettemin kende de flowcytometrie ook vele nadelen. Maar sinds het laatste decennium heeft men door verdere technologische vooruitgang reeds veel van de nadelen weten te overkomen. Zo heeft men heden ten dage reeds een breed spectrum van antistoffen ter beschikking om zo de vele verschillende clusters of differentiatie (CD), die reeds langer gekend waren, nuttig te kunnen gebruiken bij de differentiatie van alle verschillende subpopulaties. Tevens beschikt men over meer gesofisticeerde instrumenten en bestaat er momenteel 8- of meer-kleuren flowcytometrie, waardoor men meerdere antigenen simultaan kan bepalen waarmee de specificiteit van het immunofenotype vergroot. De laatste jaren is er, door het ruim aanbod van de huidig beschikbare antistoffen, ook steeds meer onderzoek gedaan naar het immunofenotype van de verschillende cellijnen, om zo bij elke maligne cellijn een eigen immunofenotypisch karakter te kunnen bepalen. Door al deze innovaties is er ook een stijging van de sensitiviteit tot stand gekomen en is men in staat om zeer kleine populaties van maligne cellen te herkennen tussen een normale celpopulatie. (1-8)

Via de techniek van de flowcytometrie kan het antigen-expressiepatroon (fenotype) van intacte cellen bepaald worden. De preanalytische staalvoorbereiding bestaat uit het binden van met fluorochroom (fluorescerende kleurstof) geconjugeerde antistoffen aan de eventueel aanwezige antigenen. Overbodige antistoffen worden weggewassen alvorens presentatie van het staal op de flowcytometer. Via hydrodynamische focusing worden de verschillende cellen 1 voor 1 gepresenteerd ter hoogte van de focus alwaar de cellen via 1 of meer laserstralen passeren. Bij het onderbreken van deze laserstralen ontstaat er een lichtverstrooiing die door detectoren onder verschillende hoeken gemeten wordt. Via deze detectoren bepaalt men de forward scatter (FSC) en de side scatter (SSC), waarmee men respectievelijk informatie over de celgrootte en de interne celstructuur kan bekomen. Tevens gaan de fluorochromen onder invloed van de lasers geëxciteerd worden en het resulterende fluorescentie emissiepatroon wordt opgevangen door fluorescentie detectoren. Afhankelijk van het emissiespectrum kan men zo weten welke antistoffen gebonden zijn en welke antigenen dus op de cellen aanwezig zijn. Al deze gegevens worden omgezet in elektrische signalen en via data-analyse omgezet in handig te interpreteren resultaten waarmee men het fenotype van de verschillende cellen in het staal kan bepalen. Ook de fluorescentie intensiteit (MFI = mean fluorescence intensity) geeft belangrijke informatie over het expressiepatroon. (2,4,8)

Ondertussen wordt flowcytometrie reeds in verschillende laboratoria als standaard onderzoek gebruikt bij de diagnostiek en opvolging van verschillende hematologische neoplasieën zoals acute leukemie, lymfomen, myelodysplastisch syndroom (MDS), paroxysmale nachtelijke hematurie (PNH),

Echter één van de grootste nadelen aan het gebruik van flowcytometrie bij de evaluatie van hematologische maligniteiten vloeit voort uit het feit dat er ondanks het wijdverspreide gebruik in de routine er toch zowel in België als in Europa een grote, niet te onderschatten variabiliteit bestaat in de gebruikte reagentia en in de manier van rapportering van de resultaten. Elk diagnostisch centrum heeft aan de hand van opzoekwerk op basis van evidence based medicine, de beschikbare apparatuur, het aantal en type van simultaan bruikbaar beschikbare fluorochromen en na grondige validatie, eigen in-house antistofpanels opgesteld waaruit men na interpretatie goede betrouwbare resultaten kan bekomen. Hierdoor is er geen tot weinig sprake van uniformiteit tussen verschillende laboratoria, waardoor men moeilijk de hematologische neoplasie kan opvolgen bij een transfer van de patiënt naar een ander ziekenhuis. (1-3,5)

Gezien deze tekortkomingen en gezien het succes van de standaardisatie in de moleculaire technieken hebben, vergelijkbaar met de Europese Netwerken voor moleculaire diagnostiek, een aantal diagnostische laboratoria samen overlegd, en dezen hebben in 2004/2005 een aanvraag ingediend bij de Europese Commissie getiteld "Flow cytometry for fast and sensitive diagnosis and follow-up of hematological malignancies" met het acroniem EuroFlow consortium om voor de flowcytometrische immunofenotypering ook een gelijkaardige standaardisering te kunnen bereiken, om zo meer uniforme resultaten te kunnen bekomen die gemakkelijk geïnterpreteerd kunnen worden over verschillende laboratoria heen. (1)

Naar aanleiding van deze standaardisatie in de flowcytometrie heeft de staf hematologie van het Jessa laboratorium besloten om over te schakelen op nieuwe antistofpanels gebruik makend van FACSCanto II (BD Biosciences) met de mogelijkheid tot 8-kleuren flowcytometrie. Er is beoogd om bij de selectie van de antistofpanels een compromis te bereiken tussen het voorstel van het EuroFlow consortium, de WHO 2008 classificatie en de RIZIV voorwaarden voor terugbetaling (zie ook vraag 2).

Voorheen werden er in het Jessa laboratorium reeds twee flowcytometers, met mogelijkheid tot 6-kleuren flowcytometrie (FACSCanto A en FACSCanto II (BD Biosciences)) gebruikt voor het inzetten van eigenhandig opgestelde antistofpanels. Met deze in-house antistofpanels is men goed vertrouwd en behaalt men goede resultaten. Afhankelijk van de voorgeschiedenis of van de cytomorfolologische bevindingen gaat men de desgewenste antistofpanels inzetten die kunnen bijdragen tot de diagnose of opvolging. Onder de oude omstandigheden hebben we de keuze uit ongeveer 14 panels met afhankelijk van het panel verschillende antistoffen die ingezet worden, gaande van 4 tot 31 antistoffen. Eén van de nadelen van de huidige methode is dat deze panels in 1 fase ingezet worden, dat wil zeggen dat alle antistofbuizen uit het geselecteerde panel onmiddellijk in 1 tijd ingezet worden om daarna de resultaten te interpreteren. Door het EuroFlow consortium

wordt er echter geadviseerd om in 2 fases te werken, namelijk door te starten met een oriënteringsbuis en afhankelijk van deze resultaten en indien er een afwijkende populatie aanwezig is, verder te werken met een specifiek antistofprotocol. Door het werken met een oriënteringsbuis is het misschien mogelijk om het aantal gebruikte antistoffen te doen dalen. (1,9-12)

QUESTION(S)

- 1) Wat zijn de doelen van het EuroFlow consortium?
- 2) Welke antistofpanels passen in ons diagnostisch aanbod en wat is de betekenis van de ons ongekende markers?
- 3) Hoe verloopt de integratie in het Jessa Ziekenhuis van de gemodificeerde EuroFlowpanels?
- 4) Zien we reeds veranderingen, al dan niet positief of negatief van aard?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: "EuroFlow", "flowcytomtry", "INFINICYT", "diagnosis hematological malignancies", "hematological malignancies", "MDS", "lymphoproliferative neoplasms", "lymphoma", "leukemia", "new hematological markers", "CD35", "CD43", "CD64", "CD65", "CD71", "CD79b", "CD81", "CD105", "CD200", "LAIR-1"
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)
- 3) Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), National Guideline Clearinghouse (<http://www.ngc.org/>), Institute for Clinical Systems Improvement (<http://www.icsi.org>), The National Institute for Clinical Excellence (<http://www.nice.org.uk/>), Cochrane (<http://www.update-software.com/cochrane>), Health Technology Assessment Database (<http://www.york.ac.uk/inst/crd/hta.htm>)
- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; <http://www.nccls.org/>), International Federation of Clinical Chemistry (IFCC; <http://www.ifcc.org/ifcc.asp>), American Diabetes Association (ADA; <http://www.diabetes.org/home.jsp>), National Diabetes Information Clearinghouse (NDIC; <http://diabetes.niddk.nih.gov/>), Westgard QC (<http://www.westgard.com>), Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA; <http://www.cms.hhs.gov/clial>)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

- 1) Van Dongen JJM en Orfao A. Hoofdstuk 25 Het EuroFlow Programma. In: Van Dongen JJM, Dik WA, Langerak AW et al. Nieuwe ontwikkelingen in de Medische Immunologie 2010. Rotterdam: Afdeling Immunologie, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum, Rotterdam, 2010: 325-340.
- 2) de Tute RM. Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies. *Histopathology* 2011; 58:90-105.
- 3) Wood BL, Arroz M, Barnett D et al. 2006 Bethesda International Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematolymphoid Neoplasia by Flow Cytometry: Optimal Reagents and Reporting for the Flow Cytometric Diagnosis of Hematopoietic Neoplasia. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2007; 72B:S14-S22.
- 4) Calvo KR, McCoy CS and Stetler-Stevenson M. Chapter 14 Flow Cytometry Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia. In: Hawley TS and Hawley RG. *Flow Cytometry Protocols*, 3rd ed. Humana Press 2011: 295-316
- 5) Craig FE and Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111(8):3941-3967.
- 6) Pedreira CE, Costa ES, Almeida J et al. A Probabilistic Approach for the Evaluation of Minimal Residual Disease by Multiparameter Flow Cytometry in Leukemic B-Cell Chronic Lymphoproliferative Disorders. *Cytometry A* 2008; 73A:1141-1150.
- 7) Dunphy CH. Applications of Flow Cytometry and Immunohistochemistry to Diagnostics Hematopathology. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128:1004-1022.
- 8) Szczepanski T, Van der Velden VHJ and Van Dongen JJM. Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(7):775-796.
- 9) Willemse JL and De Schouwer P. Design, validation and implementation of 8-colour flowcytometry panels for diagnosis of hematological malignancies; a compromise between the EuroFlow approach, the WHO classification and economic viability. Abstract of the 2010 Joint congress of BVAC/ABCA and Luxembourg Cytometry Association, 2010.

- 10) Böttcher S, Rawstron A, Lucio P et al. Hoofdstuk 27 Diagnosis and Classification of Mature B-Cell Malignancies. In: Van Dongen JJM, Dik WA, Langerak AW et al. *Nieuwe ontwikkelingen in de Medische Immunologie 2010*. Rotterdam: Afdeling Immunologie, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum, Rotterdam, 2010: 355-371.
- 11) Lhermitte L, Asnafi V, Flores-Montero J et al. Hoofdstuk 28 Diagnosis and Classification of Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Van Dongen JJM, Dik WA, Langerak AW et al. *Nieuwe ontwikkelingen in de Medische Immunologie 2010*. Rotterdam: Afdeling Immunologie, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum, Rotterdam, 2010: 373-383.
- 12) Van der Velden VHJ, te Marvelde JG, Cullen M et al. Hoofdstuk 29 Flowcytometrische Immunofenotypering van Acute Myeloïde Leukemieën en Myelodysplastisch Syndroom. In: Van Dongen JJM, Dik WA, Langerak AW et al. *Nieuwe ontwikkelingen in de Medische Immunologie 2010*. Rotterdam: Afdeling Immunologie, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum, Rotterdam, 2010: 385-411.
- 13) Lecrevisse Q, Costa ES, Pedreira CE et al. Hoofdstuk 26 INFINICYT: Multidimensional Analysis of Flowcytometric Data. In: Van Dongen JJM, Dik WA, Langerak AW et al. *Nieuwe ontwikkelingen in de Medische Immunologie 2010*. Rotterdam: Afdeling Immunologie, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum, Rotterdam, 2010: 341-354.
- 14) Pedreira CE, Costa ES, Barrera S et al. Generation of Flow Cytometry Data Files with a Potentially Infinite Number of Dimensions. *Cytometry A* 2008; 73A:834-846.
- 15) Finn WG, Carter KM, Raich R et al. Analysis of Clinical Flow Cytometric Immunophenotyping Data by Clustering on Statistical Manifolds: Treating Flow Cytometry Data as High-Dimensional Objects. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2009; 76B:1-7.
- 16) Langerak AW, Tielemans D, Missotten T et al. Hoofdstuk 30 Flowcytometrische Analyse van "Small Samples". In: Van Dongen JJM, Dik WA, Langerak AW et al. *Nieuwe ontwikkelingen in de Medische Immunologie 2010*. Rotterdam: Afdeling Immunologie, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum, Rotterdam, 2010: 413-428.
- 17) Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S et al. Euroflow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Handout at 14th EHA congress, Berlin, DE; 4 June 2009.
- 18) Fukuda M and Tsuboi S. Mucin-type O-glycans and leukosialin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1455:205-217.
- 19) Lai R, Weiss LM, Chang KL et al. Frequency of CD43 expression in non-Hodgkin lymphoma. A Survey of 742 cases and further characterization of rare CD34+ follicular lymphomas. *Am J Clin Pathol.* 1999; 111(4):488-494.
- 20) Deneys V, Mazzon AM, Marques JL et al. Reference values for peripheral blood B-lymphocyte subpopulations: a basis for multiparametric immunophenotyping of abnormal lymphocytes. *Journal of Immunological Methods* 2001; 253:23-36.
- 21) Matutes E, Wotherspoon A and Catovsky D. Differential diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2007; 20(3):367-384.
- 22) Chen CC, Raikow RB, Sonmez-Alpan E et al. Classification of small B-cell lymphoid neoplasms using a paraffin section immunohistochemical panel. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2000; 8(1):1-11.
- 23) Contos MJ, Kornstein MJ, Innes DJ et al. The utility of CD20 and CD43 in subclassification of low-grade B-cell lymphoma on paraffin sections. *Mod Pathol.* 1992; 5(6):631-633.
- 24) Mitrovic Z, Ilic I, Nola M et al. CD43 expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-Cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009; 9(2):133-137.
- 25) Jung G, Eisenmann JC, Thiébault S et al. Cell surface CD43 determination improves diagnostic precision in late B-cell diseases. *Br J Haematol.* 2003; 120(3):496-499.
- 26) Astsaturov IA, Matutes E, Morilla R et al. Differential expression of B29 (CD79b) and mb-1 (CD79a) proteins in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 1996; 10(5):769-773.
- 27) Chu PG and Arber DA. CD79: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2001; 9(2):97-106.
- 28) Garcia Vela J, Delgado I, Benito L et al. CD79b expression in B cell chronic lymphocytic leukemia: its implication for minimal residual disease detection. *Leukemia* 1999; 13(10):1501-1505.

- 29) Matutes E. New additions to antibody panels in the characterisation of chronic lymphoproliferative disorders. *J Clin Pathol* 2002; 55:180-183.
- 30) Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol.* 1997; 108(4):378-382.
- 31) Barrena S, Almeida J, Yunta M et al. Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell lymphoproliferative disorders and its correlation with normal B-cell maturation. *Leukemia* 2005; 19:1367-1383.
- 32) Lin KK, Rossi L, Boles NC et al. CE81 Is Essential for the Re-entry of Hematopoietic Stem Cells to Quiescence following Stress-Induced Proliferation Via Deactivation of the Akt Pathway. *Plos Biology* 2011; 9(9):1-15.
- 33) Miyake M, Nakano K, Leki Y et al. Motility related protein 1 (MRP1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55:4127-4131.
- 34) Muzzafar T, Medeiros LJ, Wang SA et al. Aberrant Underexpression of CD81 in Precursor B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2009; 132:692-698.
- 35) Paiva B, Gutiérrez NC, Chen X et al. Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients. *Leukemia* accepted article preview 15 Feb 2012; doi:10.1038/leu.2012.42.
- 36) Palumbo GA, Parrinello N, Fargione G et al. CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research* 2009; 33:1212-1216.
- 37) Brunetti L, Di Noto R, Abate G et al. CD200/OX2, a cell surface molecule with immuno-regulatory function, is consistently expressed on hairy cell leukaemia neoplastic cells. *British Journal of Haematology* 2009; 145:665-678.
- 38) El Desoukey NA, Afify RA, Amin DG et al. CD200 expression in B-cell chronic lymphoproliferative disorders, *J Investig Med.* 2012; 60(1):56-61.
- 39) Meyaard L. The inhibitory collagen receptor LAIR-1 (CD305). *Journal of Leukocyte Biology* 2008; 83:799-803.
- 40) Van der Vuurst de Vries A-R, Clevers H, Logtenberg T et al. Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) is differentially expressed during human B cell differentiation and inhibits B cell receptor-mediated signaling. *Eur J Immunol.* 1999; 29:3160-3167.
- 41) Guc D, Canpinar H, Kucukaksu C et al. Expression of complement regulatory proteins CRI, DAF, MCP and CD59 in haematological malignancies. *Eur J Haematol.* 2000; 64:3-9.
- 42) Casasnovas RO, Slimane FK, Garand R et al. Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome. *Leukemia* 2003; 17:515-527.
- 43) Ortolani C. *Flow Cytometry of Hematological Malignancies.* Singapore: Wiley-Blackwell 2011.
- 44) Matarraz S, López A, Barrena S et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008; 22:1175-1183.
- 45) Matarraz S, López A, Barrena A et al. Bone Marrow Cells from Myelodysplastic Syndromes Show Altered Immunophenotypic Profiles That May Contribute to the Diagnosis and Prognostic Stratification of the Disease: a Pilot Study on A Series of 56 Patients. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2010; 78B:154-168.
- 46) Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N et al. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2001; 98:979-987.
- 47) Noguchi M, Sato N, Sugimori H et al. A minor E-selectin ligand, CD65, is critical for extravascular infiltration of acute myeloid leukemia cells. *Leuk Res* 2001; 25(10):847-853.
- 48) Suárez PB, Brito JL, Reyes CS et al. Congenital acute lymphoblastic leukemia: a two-case report and a review of the literature. *Eur J Pediatr* 2011; 170:531-534.
- 49) Marsee DK, Pinkus GS and Yu H. CD71 (Transferrin Receptor) An Effective Marker for Erythroid Precursors in Bone Marrow Biopsy Specimens. *Am J Clin Pathol* 2010; 134:429-435.

- 50) Dallas NA, Samuel S, Xia L et al. *Endoglin (CD105): A Marker of Tumor Vasculature and Potential Target for Therapy. Clin Cancer Res. 2008; 14(7):1931-1937.*
- 51) Lammers R, Giesert C, Grünebach F et al. *Monoclonal antibody 9C4 recognizes epithelial cellular adhesion molecule, a cell surface antigen expressed in early steps of erythropoiesis. Experimental Hematology 2002; 30:537-545.*
- 52) Bühring HJ, Müller CA, Letarte M et al. *Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. Leukemia 1991; 5(10):841-847.*
- 53) Della Porta MG, Malcovati L, Invernizzi R et al. *Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. Leukemia 2006; 20:549-555.*
- 54) Della Porta MG, Lanza F and Del Vecchio L. *Flow Cytometry Immunophenotyping for the Evaluation of Bone Marrow Dysplasia. Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 2011; 80B:201-211.*

APPRAISAL

1) Wat zijn de doelen van het Euroflow consortium?

Bij de aanvang van het nieuwe millennium bestonden er nog verschillende beperkingen binnen de flowcytometrie, die deze techniek als routineonderzoek voor de diagnose van hematologische maligniteiten nog belemmerde:

- PCR was meer sensitief vergeleken met de 4-kleuren flowcytometrie voor MRD diagnostiek
- Er waren reeds lange tijd geen nieuwe antistoffen op de markt gebracht ondanks de vele nieuwe intra- en extracellulaire proteïnen die ondertussen ontdekt waren in verschillende cellijnen.
- Er was in diezelfde tijd op oncogenetisch vlak een enorme vooruitgang geboekt met de ontdekking van vele nieuwe afwijkingen. Hierbij gepaard zijn er ook veel nieuwe oncoproteïnen ontdekt (eveneens fusie-proteïnen) waartegen ook nog geen antistoffen waren ontwikkeld.
- Een andere beperking komt voort uit het feit dat meerkleuren flowcytometrie resulteert in complexe resultaten die voor een moeilijke interpretatie en een soms eerder onoverzichtelijk eindresultaat leiden.
- Grote variabiliteit tussen verschillende laboratoria in keuze van antistoffen en rapportering van resultaten waardoor moeilijke reproduceerbaarheid en opvolging van resultaten.

Het voorbije decennium heeft men echter veel van deze beperkingen trachten te verbeteren en met de beschikbaarheid tot 8 of meer kleuren flowcytometrie, en door de ontwikkeling van een wijdverspreid breed spectrum aan nieuwe antistoffen heeft men de specificiteit en de sensitiviteit van de flowcytometrische immunofenotypering reeds enorm kunnen verbeteren. Deze innovaties speelden echter de grote variabiliteit tussen verschillende laboratoria net nog meer in de hand, gezien men nu nog meer verschillende antistoffen en rapporteringwijzen ter beschikking had. Tevens kregen we nog meer complexe databanken met verschillende resultaten. Dus de nood aan een standaardisering en nieuwe software om de verschillende data te analyseren werd steeds groter en is heden ten dage nog steeds een aandachtspunt. (1-8,13-15)

In het kader van de Bethesda Consensus conference werd er een comité opgericht bestaande uit verschillende ziekenhuizen en grote referentielaboratoria met de bedoeling om een reeks van reagentia voor te stellen die geschikt gevonden werden voor algemeen gebruik in de hematologische diagnostiek. Het was niet de bedoeling van het comité om specifieke antistofpanelen te ontwikkelen, gezien dit ook laboratoriumafhankelijk is (beschikbare apparatuur, beschikbare antistoffen, ...), maar men heeft een lijst van mogelijks interessante antigenen per cellijn naar voor gebracht om zo een eerste stap in standaardisatie te verkrijgen tussen verschillende laboratoria. Tevens stelt men dat er een paar basisprincipes zijn die men in acht moet nemen bij het opstellen van de verschillende antistofpanelen in een laboratorium:

- Antigenen met een hoge expressie zouden gekoppeld moeten worden aan eerder gedimde fluorochromen.
- Men moet minstens 1 "backbone" marker gebruiken in verschillende buizen om zo correlatie en opvolging van populaties in verschillende buizen te kunnen uitvoeren.
- Bij de selectie van antigenen bedoeld voor de identificatie van subpopulaties binnen een cellijn is het belangrijk om deze te combineren met antigenen die populatiespecifiek zijn.
- Antigenen die verschillend tot expressie komen tijdens de maturatie binnen een cellijn moet men zodanig trachten te combineren dat ze de maturatiepatronen het best accentueren, bijvoorbeeld door een vroege marker te combineren met een late marker.
- Het is ook nuttig om antigenen, die verschillend tot expressie komen in cellijnen die relatief dicht verwant zijn aan elkaar, te combineren om zo toch een differentiatie te kunnen maken tussen deze nauw verwante cellijnen. (3)

In 2004/2005 werd er een "specific targeted research project" aangevraagd bij de Europese Commissie getiteld "Flow cytometry for fast and sensitive diagnosis and follow-up of hematological malignancies" met het acroniem:

EuroFlow. Dit EuroFlow consortium bestaat uit 8 universitaire laboratoria, 4 geaffilieerde deelnemers (deze zijn later bijgevoegd) en 2 small-medium Enterprises (SME's) namelijk Cytognos en Dynamics. Er werden bij de aanvang duidelijke doelstellingen gedefinieerd om de flowcytometrische immunofenotypering van hematologische neoplasieën te innoveren en te standaardiseren, gebruik makend van de nieuwe technische mogelijkheden. Aan de hand van deze doelen heeft men een duidelijke taakverdeling opgesteld. Om de resultaten van het gezamenlijk onderzoek te kunnen bespreken en evalueren werd er ongeveer 1 maal om de 4 maanden een EuroFlow conferentie georganiseerd. (1)

De volgende 8 doelen werden vooropgesteld:

- 1) Ontwikkeling van nieuwe antistoffen, vooral tegen intracellulaire proteïnen zoals oncoproteïnen en nieuwe differentiatie-/classificatiemarkers.
- 2) Ontwikkeling van een nieuwe immunobeadtechniek voor detectie van oncogene fusie-eiwitten.

Ondertussen heeft men met het EuroFlow consortium reeds diverse antistoffen ontwikkeld. Zo heeft men ook tegen de beide zijden van de zeven meest bekende fusie-eiwitten antistoffen aangemaakt, met de daarbijhorende immunobead assays. Met deze immunobead assays kan men in 1 stap meerdere fusie-eiwitten evalueren in lysaten. (1)

- 3) Ontwikkeling van fluorescence resonance energy transfer (FRET) techniek voor de detectie van fusie-eiwitten op single cell niveau.

Dit betreft een nieuwe techniek waarbij men de antistoffen tegen beide zijden van een fusie-eiwit aan elkaar koppelt, waardoor de 2 fluorochromen zodanig dicht bij elkaar komen te liggen dat ze een duochrome vormen en dus een specifiek FRET signaal kunnen geven. (1)

- 4) Ontwikkeling en verdere verbetering van nieuwe software voor snel en eenvoudig analyseren en integreren van databanken van 8-kleurenanalyse en voor automatische patroonherkenning van normale, regenererende/reactieve en maligne leukocytenpopulaties.

Aan de oude software van Cytognos heeft men aanpassingen en verbeteringen aangebracht en in 2008 is deze software onder de naam INFINICYT software beschikbaar gemaakt. Via deze nieuwe software wil men aan makkelijke data-analyse kunnen doen waarbij men bijvoorbeeld patiëntspecifiek fenotype kan vergelijken met een grote database van gekende fenotypes om zo tot een vergelijkbare diagnose te kunnen komen. Men kan via de software, indien men voldoende backbone markers gebruikt, alle resultaten van verschillende buizen samenvoegen en berekenen om zo nog nauwkeurigere en meer gedetailleerde resultaten per subpopulatie te bekomen. Tevens is met INFINICYT mogelijk om nieuwe stalen van eenzelfde patiënt snel te vergelijken om zo op eenvoudige wijze de therapie te evalueren. (13-15)

- 5) Evaluatie en selectie van een betrouwbare combinatie van fluorochromen, geschikt voor 8-kleuren flowcytometrie.

Men heeft, rekening houdend met de criteria die vereist zijn voor een goede fluorochrome selectie, en na uitgebreid testen van verschillende fluorochrome combinaties, acht fluorochromen geselecteerd die met 3 lasers gedetecteerd kunnen worden. In het bijzonder via de violet laser Pacific Blue (of Horizon V450) en Pacific Orange (of Horizon V500), via de Argon laser FITC, PE, PerCP en PE-Cy7 en tel slotte via de Helium-Neon laser APC en APC-H7. (1,10-12)

- 6) Ontwikkeling van gestandaardiseerde procedures voor het instellen van de flowcytometer en voor de antistofkleuringen.

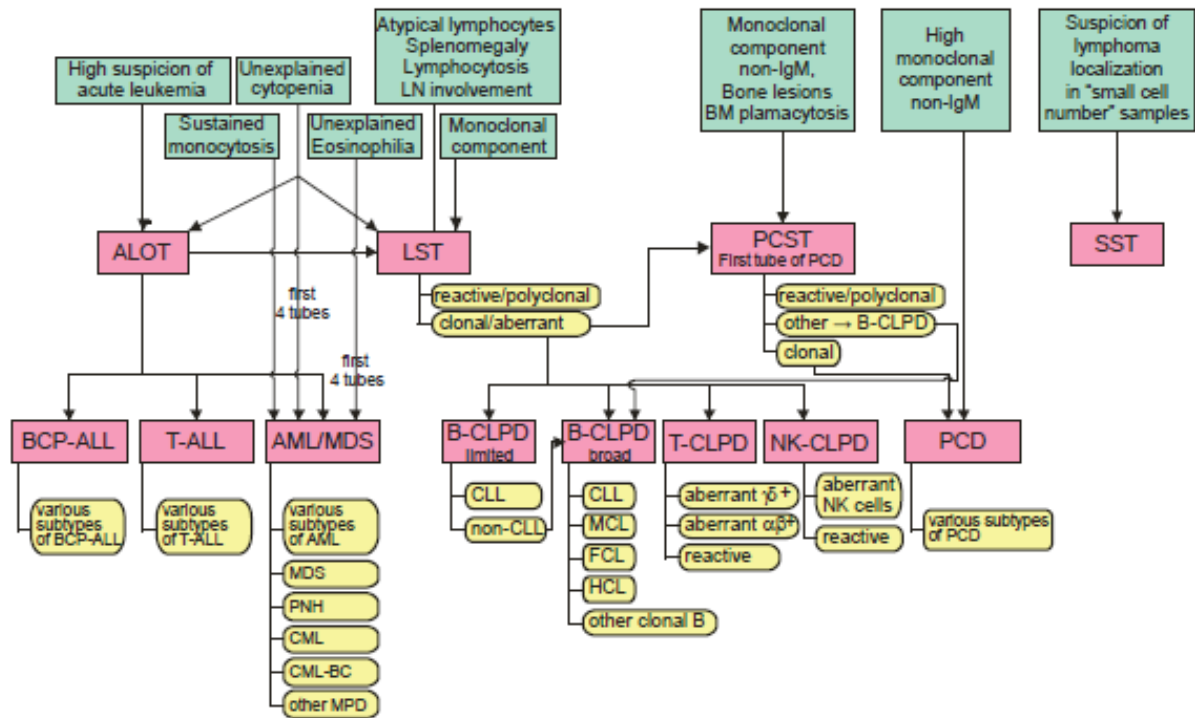
Niet alleen de gebruikte antistoffen en interpretatietechnieken behoeven standaardisatie te ondergaan maar ook alle technische procedures zoals de instrumentinstellingen, de compensatie-instellingen en de preanalytische monstervoorbereiding en kleuringen dienen gestandaardiseerd te worden (bijlage 1). Dit is essentieel om vergelijkbare resultaten te garanderen tussen verschillende laboratoria en om de bekomen resultaten samen te kunnen voegen in 1 database. (1)

- 7) Ontwikkeling, standaardisatie en klinische evaluatie van 8-kleuren antistofpanels voor diagnose en (prognostische) classificatie van hematologische maligniteiten.

Vóór het EuroFlow project heeft men zich vooral beperkt tot het opstellen van consensusvoorstellen voor markerkeuzes voor de diagnose en classificatie van hematologische neoplasieën. Er werden nooit specifieke antistofpanels voorgesteld en ook geen specifieke fluorochromen aan bepaalde antistoffen gekoppeld, zodat er nog steeds een grote variabiliteit

mogelijk bleef bij het gebruik van deze consensus voorstellen. Door deze beperking zijn de voorgaande (inter)nationale consensusprotocollen nooit verder gegaan dan het globaal beschrijven van de immunofenotypische kenmerken van de verschillende normale hematologische cellijnen en de verschillende hematologische neoplasieën.

Het EuroFlow consortium heeft echter zowel voor de diagnose als voor de opvolging getracht om een aantal goed gedefinieerde antistofprotocollen op te stellen. Deze zijn opgesteld in 2 fases, waarbij de eerste fase telkens uit één screenings- of oriënteringsbuis bestaat, die geselecteerd wordt op basis van de reeds aanwezige klinische en/of laboratoriumgegevens. Deze buizen zijn zodanig opgesteld dat ze voldoende informatie bekomen om zo in de tweede fase een juiste keuze te kunnen maken over welk ziektecategorie specifieke antistofprotocol men verder kan gebruiken. Aan de hand van deze antistofprotocollen heeft men een diagnostisch flowdiagram (figuur 1) opgesteld. (1-12,16)



Figuur 1: Diagnostisch flowdiagram met de voorgestelde EuroFlow classificatieprotocollen (1)

De uiteindelijke antistofprotocollen bestaan uit 4 “singletube” screeningsbuizen en 7 “Multi-tube” diagnose- en classificatieprotocollen (bijlage 2). (17)

- 8) Ontwikkeling, standaardisatie en klinische evaluatie van 8-kleuren antistofpanels voor de evaluatie van therapie-effectiviteit via het monitoren van de maligne cellen tijdens en na behandeling (MRD-diagnostiek).

De EuroFlow MRD buizen en protocollen zijn momenteel nog in de ontwerp-/testfasen. Net zoals bij de diagnose- en classificatieprotocollen zijn er meerdere testrondes nodig om zo de meest optimale protocollen op te kunnen stellen. (1)

2) Welke antistofpanels passen in ons diagnostisch aanbod en wat is de betekenis van de ons ongekende markers?

In het Jessa laboratorium zijn we onder de huidige omstandigheden voornamelijk in de 5 laatstgenoemde doelen van het EuroFlow consortium geïnteresseerd. Na aankoop van de 8-kleuren flowcytometer en de INFINICYT software zijn we op zoek gegaan naar wat in het Jessa laboratorium de meest geschikte panels en antistoffen zijn voor een optimale diagnostiek, zowel in de diagnosestelling als in de follow-up van de hematologische neoplasieën. Het gebruik van de flowcytometrie voor het opzoeken van fusie-eiwitten en oncoproteïnen kan mogelijk in de toekomst nog uitgebreid worden aan het diagnostisch gamma. Maar momenteel is er besloten om in eerste instantie de aandacht te vestigen op de standaardisatie en de vernieuwing van de antistofpanels. Vervolgens wil men in tweede instantie de data-analyse via de INFINICYT-software goed leren gebruiken om zo snel tot een goede interpretatie van de resultaten te kunnen komen.

Om de antistof- en panelectie goed te kunnen evalueren is men te rade gegaan bij twee andere laboratoria die reeds via 8-kleuren flowcytometrie met een gemodificeerde versie van het EuroFlow programma in de routine gestart zijn; met name de klinische laboratoria van Ziekenhuis Netwerk Antwerpen (ZNA) en AZ Turnhout. Op deze 2 faciliteiten hebben ze elk een eigen aangepaste versie van de EuroFlow panels opgesteld die, ondanks kleine verschillen, ongeveer gelijkaardig zijn. Aan de hand van deze gemodificeerde versies en het volledig aanbod van de EuroFlow panels is er in het Jessa laboratorium na grondige evaluatie besloten om onze gemodificeerde antistofpanels mede te baseren op de antistofpanels die reeds gebruikt worden zowel in het ZNA als in AZ Turnhout. Er zijn verschillende redenen om het Euroflow programma niet volledig over te nemen:

- Eén van de redenen om het EuroFlow programma niet volledig over te nemen bestaat uit de uitgebreidheid van het aantal antistoffen dat voorgesteld is voor het volledige EuroFlow programma. Dit jaagt de kosten van de flowcytometrische immunofenotypering meteen de hoogte in, terwijl bij de aangepaste versie het aantal antistoffen significant gereduceerd is, waardoor men minder verschillende antistoffen tot beschikking moet hebben in het laboratorium.
- Bij het opstellen van de EuroFlow panels is er vooral rekening gehouden met de specifieke eigenschappen van de verschillende markers om zo een optimale differentiatie van alle verschillende subpopulaties te kunnen bekomen, terwijl er minder rekening gehouden is met de markers die gebruikt worden bij de WHO 2008 classificatie en bij andere internationale scoresystemen. Eveneens zijn er in België bepaalde voorwaarden opgelegd door het RIZIV met betrekking tot terugbetaling. Deze terugbetalingsvoorwaarden zijn ook niet door het EuroFlow consortium in acht genomen, gezien zij een programma voorstellen dat voor heel Europa van toepassing zou kunnen zijn. Bij de opstelling van onze gemodificeerde panels is er bijgevolg getracht om een compromis te bekomen tussen het voorstel van het EuroFlow consortium, de WHO classificatie en bepaalde RIZIV voorwaarden
- Een ander aspect dat mee voor de aanpassing van de antistofpanels zorgt, bestaat in het feit dat de richtlijn voor de externe kwaliteitscontroles Leukemie/Lymfoomtypering die door het SKML (Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoriumdiagnostiek) verspreid worden in België momenteel antistoffen bevat die niet worden gebruikt in de EuroFlow panels.
- Verder is het ook belangrijk dat we tegemoet komen aan de specifieke vraag van de oncologen, werkzaam in het Jessa Ziekenhuis, en bijgevolg is er voor de selectie van sommige markers ook rekening gehouden met hun wensen. (1,9-12,17)

Zo hebben we in het Jessa laboratorium de volgende panels opgesteld voor diagnose en opvolging van de verschillende hematologische neoplasieën (zie bijlage 3).

In deze gemodificeerde antistofpanels worden antistoffen tegen enkele door het Jessa laboratorium nog niet eerder gebruikte antigenen, bepaald. Zowel in het B-CLPD panel als in het AL/MDS panel vinden we enkele van deze nieuwe antigenen terug. Voor een goede interpretatie van deze nieuwe antigenen zijn we in de literatuur op zoek gegaan naar deze antigenen en hun gebruik om deze bevindingen te vergelijken met de resultaten die we tijdens onze validatie van de nieuwe antistofpanels bekomen.

In het B-CLPD panel betreft het de volgende antigenen CD43, CD79b, CD81, CD200 en LAIR-1, terwijl men in het AL/MDS panel nog geen ervaring had in het Jessa laboratorium met CD35, CD64, CD65, CD71 en CD105.

CD43

CD43, ook wel leukosialine genoemd, is een transmembraan sialoglycoproteïne dat een rol speelt bij de celactivatie en bij celadhesie tijdens de immuunrespons. (18)

Volgens Lai et al. (1999) en Deneys et al. (2001) kan CD43 nuttig zijn bij de classificatie van mature B-cel neoplasieën. Lai et al. (1999) onderzocht de aanwezigheid van CD43 bij 742 mature B-cel neoplasieën en stelde vast dat CD43 expressie op B-cellen suggestief is voor maligniteit. Volgens Lai et al. komt CD43 tot expressie bij > 90% van de mantelcellymfomen (MCL), small lymphocytic lymphomas (SLL), chronische lymfatische leukemie (CLL), Burkitt lymfoom (BL); bij 20-40% van de nodaal marginale zone lymfomen (NMZL), extranodaal marginale zone lymfomen (MALT lymfoom), diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) en lymfoplasmacytoïd lymfoom (LPL); terwijl slechts 0-6 % van de splenisch marginale zone lymfoom (SMZL) en folliculair lymfomen (FL) CD43 tot expressie brengen (tabel 1). (19-20)

CD43 expressie bij n= 742	90% +	20-40% +	0-6% +
---------------------------------	-------	----------	--------

<ul style="list-style-type: none"> - T-cell lymfomen - Mantelcellymfoom - Small lymphocytic lymphoma - Chronisch lymfatisch leukemie - Burkitt lymfoom 	<ul style="list-style-type: none"> - Nodaal en extranodaal marginale zone lymfoom - Diffuus large B-cell lymfoom - Lymfoplasmacytoid lymfoom 	<ul style="list-style-type: none"> - splenisch marginale zone lymfoom - Folliculair lymfoom
---	---	---

Tabel 1 naar Lai et al. (1999) (19)

Matutes et al. (2007), Chen et al. (2000) en Contos et al. (1992) hebben ook reeds met vergelijkbare eerder kleinschalige studies aangetoond dat een FL CD43 – is terwijl een CLL eerder CD43 + is. (21-23)

Mitrovic et al. (2009) kwam na een onderzoek bij 119 nieuw gediagnosticeerde DLBCL waarvan er 26% CD43 + waren, tot de conclusie dat de patiënten met een CD43 + DLBCL een slechtere overall survival hadden vergeleken met de CD43 – DLBCL patiënten (45 versus 76%). (24)

Ten slotte heeft Jung et al. (2003) geprobeerd om CD43 mee te nemen in het immunologisch scoresysteem voor de diagnose van CLL. Door toevoeging van CD43 aan het reeds gebruikte scoresysteem bekwam hij een accuraatheid van 98.6% bij het toepassen van het uitgebreide scoresysteem op een groep van 74 CLL patiënten en een normale populatie van gezonde vrijwilligers. (25)

Met de huidige beschikbare onderzoeken kunnen we samengevat stellen dat CD43 een marker is die men kan gebruiken bij de differentieel diagnose van een CLL en een FL. Verder kan men CD43 ook gebruiken bij het opvolgen van de MRD bij een CLL. CD43 zou ook een eerder negatieve prognostische marker zijn bij een DLBCL.

CD79b

De heterodimeer CD79 bestaat uit CD79a en CD79b. CD79a werd eerder al gebruikt, maar het gebruik van CD79b werd in het Jessa laboratorium nog niet eerder toegepast. Dit antigeen maakt gebonden aan membraanimmuunglobuline van B-cellen deel uit van het antigeen receptor complex. Na binding aan het immuunglobuline start een signaaltransductie in de cel die een rol speelt bij de immuniteit. CD79b komt reeds vroeg in de uitrijping van de B-cellen tot expressie en blijft ook lang aanwezig, waardoor het als pan-B marker in aanmerking komt. (25)

Zowel Astsaturou et al. (1996) en Chu et al. (2001) toonden aan dat CD79b nuttig kan zijn bij de diagnose van een B acute lymfatische leukemie/B lymfoblastisch lymfoom (B-ALL/LBL) type precursor B-cel acute lymfatische leukemie (pre-B-ALL) gezien CD79b bij deze blastaire cellen reeds tot expressie komt in tegenstelling tot de expressie van de andere pan-B markers die meestal nog negatief is. (26-27)

Garcia Vela et al. (1999) toonde in een kleinschalig onderzoek aan, waarbij men de expressie van CD79b op 40 CLL patiënten is nagegaan, dat de expressie van CD79b bij 92.5% ofwel negatief (42.5%) ofwel gedimd (50%) is. Waarmee men aantoont dat bij een CLL CD79b negatief of weak is. Matutes et al. (2002) toonde vergelijkbare resultaten aan. (28-29)

Diezelfde Matutes et al. (2007) en Moreau et al. (1997) testten ook de mogelijkheid uit om CD79b toe te voegen aan het immunologisch scoresysteem voor CLL's (tabel 2). Hierbij paste men het scoresysteem toe op een groep van 298 CLL en 166 non-CLL patiënten. Bij het oorspronkelijk scoresysteem, waarbij men een score krijgt voor de volgende karakteristieken: CD5 +/ CD23 +/ FMC7 -/ Smlg weak (IgM of IgD)/ CD22 – of weak, bekwam men een accuraatheid van 91,8% indien men voldeed aan 4 of meer van de vereiste karakteristieken. Bij toevoeging van CD79b – of weak aan de criteria bekwam men een accuraatheid van 96,6%. Echter indien men CD22 verving door CD79b verkreeg men blijkbaar een accuraatheid van 96,8% met de voorwaarde dat er maar aan 3 of meer criteria voldaan moet zijn. Het betreft ditzelfde scoresysteem waarbij Jung et al. (2003) een accuraatheid van 98,6% beweert te bekomen door toevoeging van CD43 aan al de criteria. Dit betrof echter een veel kleinschaligere studie dan de studie van Matutes et al. (2007) en men vergeleek ook een populatie van CLL patiënten met een gezonde populatie. (21,25,30)

Table 2. Scoring system for the diagnosis of chronic lymphocytic leukaemia (CLL).

Marker	Points	
	1	0
CD5	Positive	Negative
CD23	Positive	Negative
FMC7	Negative	Positive
Smlg	Weak	Moderate/strong
CD22/CD79b	Weak/negative	Moderate/strong

Scores in CLL range from 3 to 5 while in the other B-cell disorders they are 0–2.

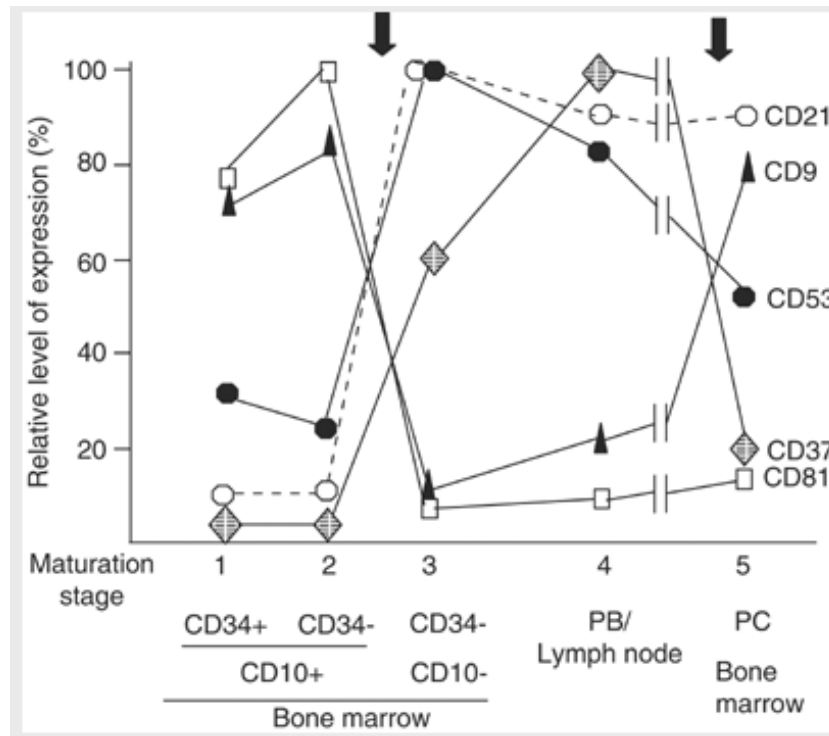
Tabel 2: immuunfenotypisch scoresysteem voor CLL naar Matutes et al. (2007) (25)

Uiteindelijk kan men besluiten dat CD79b te gebruiken is als een pan-B marker. CD79b kan helpen bij de diagnose van B-ALL/LBL type pre-B-ALL en bij de diagnose en MRD van CLL.

CD81

CD81 is een tetraspanine dat behoort tot een groep van nauw aan elkaar gerelateerde membraan proteïnes (CD9, CD37, CD53, CD81). Deze tetraspanines komen vrij aan het oppervlak voor of in interactie met andere proteïnes. Ze hebben verschillende functies en spelen bijgevolg een rol bij de celadhesie, de celactivatie, de celproliferatie en eveneens bij de celmigratie. Zo blijkt het CD9 en CD81 te dalen wanneer een cel klaar is voor migratie van het beenmerg naar het perifeer bloed. (31-32)

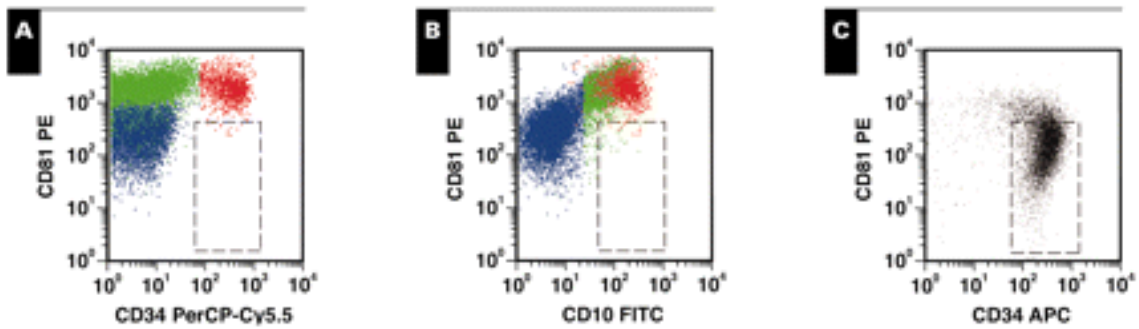
Barrena et al. (2005) deed onderzoek naar het expressiepatroon van de tetraspanines in een gezonde populatie leukocyten (figuur 2). (31)



Figuur 2: Expressiepatroon tetraspanines in gezonde leukocyten (31)

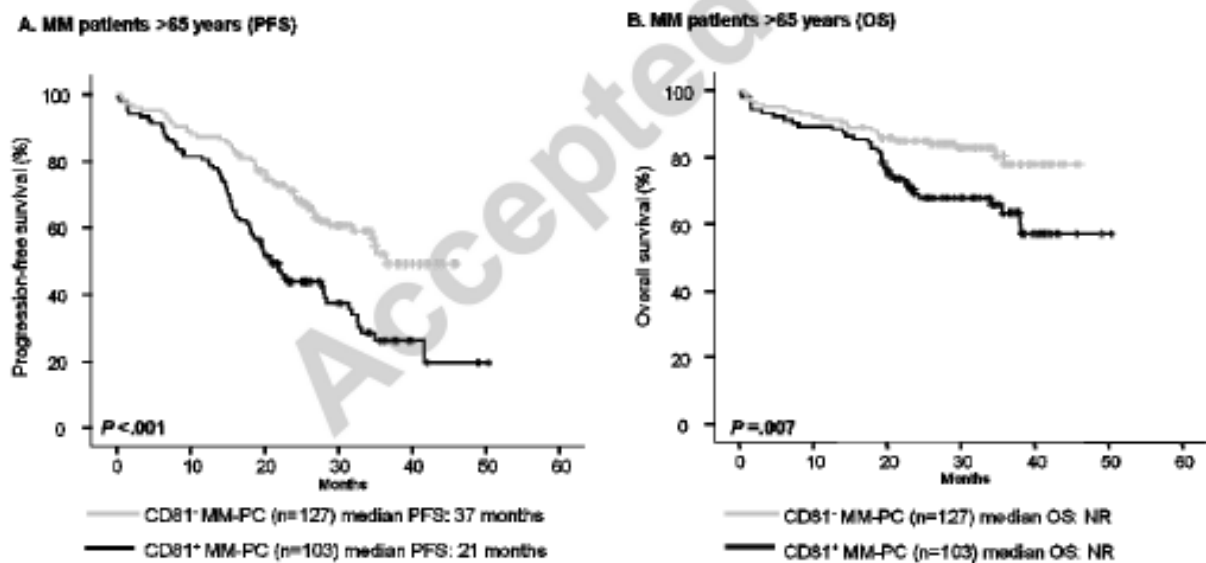
Vervolgens bestudeerde Barrena et al. (2005) het expressiepatroon van CD81 en de andere tetraspanines bij 67 patiënten met de nieuwe diagnose van een klonale B-cel neoplasie geassocieerd volgens de WHO classificatie op basis van de kliniek, morfologie, immunofenotypering en moleculaire diagnostiek. Hieruit kon men concluderen dat CD81 een onderexpressie vertoonde op de CD34+ precursorcellen bij B-ALL/LBL type pre-B-ALL. Tevens merkte men een onderexpressie van CD81 op bij CLL. Een andere bemerking die opviel is dat een lagere expressie of volledig verlies van expressie van CD9 en CD81, zoals eerder reeds aangetoond bij andere carcinoma's (Miyake et al. (1995)), gepaard gaat met een eerder slechtere prognose door grotere kans op metastasen. (31,33)

Een deel van de studie van Barrena et al. (2005) werd door Muzzafar et al. (2009) herhaald met een grotere populatie (n= 98 nieuwe pre-B-ALL patiënten en 139 MRD stalen). Zij stelden de volgende criteria op als threshold voor de diagnose van pre-B-ALL: Indien > 10% van de CD19+/CD34+ progenitorcellen een gedaalde CD81 expressie hebben of indien er discrete clusters met een onderexpressie van CD81 kunnen aangetoond worden kan men de diagnose van pre-B-ALL stellen (figuur 3). Met dit criterium behaalt men een sensitiviteit van 87% en een specificiteit van > 99%. Voor de MRD diagnostiek adviseert men wel om altijd rekening te houden met minstens 2 markers om vals positieve resultaten te vermijden. Hier merkt men ook op dat vooral de CD34+ pre-B-ALL cellen een onderexpressie van CD81 kennen vergeleken met de CD34- pre-B-ALL cellen. (34)



Figuur 3: CD81 expressie bij normale hematogonen (A,B) en bij pre-B-ALL (C) (33)

Uit een zeer recente studie van Paiva et al. (2012) blijkt dat CD81 ook een prognostische factor is bij een plasmacel myeloom (PCM). Zo blijken de CD81- MM een langere progression free survival en een betere overall survival te hebben vergeleken met CD81+ PCM (figuur 4). (35)



Figuur 4: CD81 expressie bij MM (35)

CD81 blijkt dus nuttig te zijn bij de diagnose en opvolging (MRD) van B-ALL/LBL type pre-B-ALL en CLL waarbij men telkens een onderexpressie van CD81 zal waarnemen. Verder zal na verder onderzoek CD81 misschien ook een rol kunnen spelen bij de prognostische classificatie van PCM.

CD200

Het membraan glycoproteïne CD200 heeft een inhiberend effect op de myeloïde celactivatie, op de activatie van NK-cellen en op de macrofagen.

Deze marker wordt door Palumbo et al. (2009) voorgedragen als een handige marker voor het onderscheid te maken tussen een CLL en een MCL bij een CD5+ B-lymfocytose. Men merkt op dat de huidige criteria die konden helpen bij het maken van deze differentiatie, zoals CD23-, FMC7+, Cycline D1+ en de moleculaire afwijking t(11;14), allen sporadisch tekortschieten bij de diagnose van een MCL. Terwijl zichzelf in een studie met 79 B-CLL en 14 MCL patiënten aangetoond hebben dat CD23 bij 43% van de MCL positief bleek te zijn, terwijl er slechts 21% CD200+ was (tabel 3). Deze 3 MCL gevallen met CD200+ bleken ook allen een zeer lage MFI te hebben. Bijgevolg stelde Palumbo et al. een criterium op voor MCL waarbij expressie van CD200 – of weak is. (36)

	CLL (n=79)	MCL (n=14)
CD23 +	79	6

CD200 +	79	3 (lage intensiteit)
---------	----	----------------------

Tabel 3 naar Palumbo et al. (2009) (36)

Brunetti et al. (2009) en El Desoukey et al. (2012) toonden allebei aan dat CD200 ook een hoge expressie bij hairy cell leukemia (HCL) vertoont. (37-38)

Men kan dus concluderen dat CD200 kan gebruikt worden voor de diagnose van een MCL (CD200 -) en bij een HCL (CD200 ++). Ook is CD200 een nuttige marker bij de diagnose en opvolging van CLL patiënten.

LAIR-I

Leukocyt-associated immunoglobuline-like receptor-I (LAIR-I) oftewel CD305 komt op bijna alle cellen van het immuunsysteem tot expressie en speelt een rol bij verschillende acties van de immuunrespons. (39-40)

Van der Vuurst de Vries et al. (1999) beschreef de expressie van LAIR-I op de verschillende subpopulaties van de B-cellen in zowel beenmerg, perifere bloed als klier materiaal. Hieruit maakt men de suggestie dat de memory B-cellen eventueel nog verder onder te verdelen zijn in subpopulaties. Verder onderzocht men de LAIR-I expressie bij een groep patiënten met een B-neoplasie waaruit men kon concluderen dat LAIR-I over het algemeen positief is bij B-ALL/LBL en CLL, terwijl deze marker net negatief is bij PCM. (40)

Böttcher et al. (2010) stelt dat LAIR-I kan helpen bij de diagnose van HCL waarbij de expressie van LAIR-I duidelijk gestegen is (figuur 5). (10)

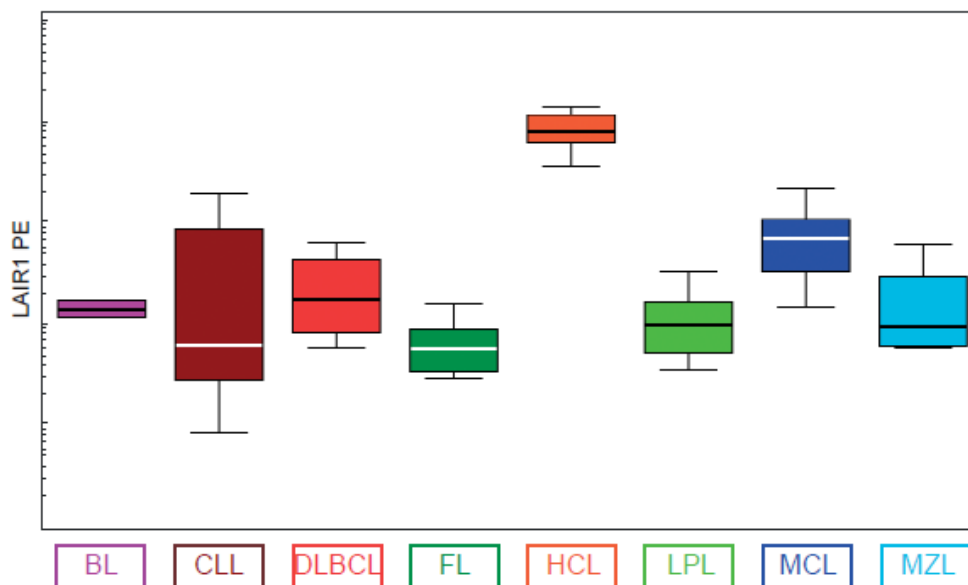


Figure 5. Box-plot diagram of LAIR expression in mature B-cell malignancies.

Figuur 5: LAIR-I expressie (10)

Finaal kunnen we stellen dat bij een HCL de expressie van LAIR-I sterk positief is.

CD35

CD35 of complement receptor-1 zorgt voor een negatieve regulatie van de complement cascade. In deze molecule bevindt zich eveneens het Knops-antigen dat deel uitmaakt van het 25^{ste} bloedgroepsysteem.

Guc et al. (2000) toonde aan dat CD35 tot expressie komt op alle hematologische neoplasieën (acute myeloïde leukemie (AML), chronische myeloïde leukemie (CML), ALL en CLL) maar dat er blijkbaar een iets lagere CD35 expressie is bij AML, dit verschil was echter niet significant. (41)

Casasnovas et al. (2003) kon met behulp van 7 markers waaronder CD35 een classificatiesysteem opstellen voor AML waarbij hij een onderverdeling van 5 subtypes AML onderscheidde. Uit zijn onderzoek op 909 AML patiënten kon hij verder concluderen dat een fenotype met CD35+ of CD36+ in combinatie met CD15+ altijd wijst op een AML met een monocytair component. (42)

Van der Velden et al. (2010) adviseert CD35 als een marker voor de monocytair uitrijping die men kan gebruiken bij de differentiatie tussen onrijpe monocytair en myeloïde cellen.

Ortolani (handboek) beschrijft een gedaalde expressie of helemaal geen expressie van CD35 op de neutrofielen bij MDS. (43)

CD35 kunnen we dus mogelijks gebruiken als monocytair marker bij AML en als criterium voor de interpretatie van MDS.

CD64/CD65

CD64, een Fc-gamma-receptor die met hoge affiniteit IgG-type antistoffen bindt en dus een belangrijke rol speelt bij zowel de humorale en de cellulaire immunologische respons en CD65, een fucoganglioside dat het ligand voor CD62 vormt en via deze wel een rol heeft bij de celadhesie, zijn in de literatuur regelmatig samen bestudeerd in kader van MDS diagnostiek via flowcytometrie.

Mattaraz et al. (2008) vergeleek de flowcytometrische immunofenotypering van 50 MDS patiënten met die van 29 normale of reactieve beenmergstalen. Hieruit werd de conclusie getrokken dat bij de MDS patiënten de CD34+ cellen een hogere expressie van CD117 en CD13 vertonen, terwijl er een lagere expressie van CD64, CD65 en CyMPO optreedt. (44)

In een andere studie toont Mattaraz et al. (2010) aan op een populatie van 59 MDS patiënten dat bij MDS de monocytten een gedaalde expressie van CD64 vertonen (16-34%), terwijl de uitrijpende neutrofielen een lagere expressie vertonen van CD15, CD65 en CyMPO (39-43%).

Stetler-Stevenson et al. (2001) vermeldt tevens een gedaalde expressie van CD64 op de neutrofielen bij MDS. (45-46)

Van der Velden et al. (2010) toont dan weer aan dat CD64 reeds vroeg in de monocyttaire uitrijping tot expressie komt waardoor deze marker kan gebruikt worden bij de differentiatie tussen monocyttaire versus myeloïde progenitorcellen bij AML. Ortolani suggereert eenzelfde betekenis voor het gebruik van CD64 bij AML. (12,43)

In een onderzoek met 30 AML patiënten waaronder 4 AML patiënten met extravasculaire infiltratie toont Noguchi et al. (2001) aan dat de 4 casussen met extravasculaire infiltratie een significante stijging van CD65 expressie vertoonden. Waardoor ze suggereren dat CD65 een kritisch adhesiemolecule is voor extravasculaire AML infiltratie en dus potentieel prognostisch een slechtere outcome geeft. (47)

Suárez et al. (2011) beschreef 2 casussen van congenitale ALL met een afwijking in het *MLL*-gen, CD10 – expressie en de aanwezigheid van een bifenotypisch karakter (zowel lymfoïede als myeloïde markers (CD65+)) op de ALL cellen, met beiden een fatale afloop. Dit fenotypisch en genotypisch karakter blijkt volgens hen een slechte prognose te hebben. (48)

Ondanks de tot nu toe beperkte resultaten kunnen we dus stellen dat CD64 kan gebruikt worden bij AML voor te differentiëren tussen monocyttaire versus myeloïde cellen. Verder blijkt dat er bij de immunoflowcytometrische diagnostiek bepaalde patronen kunnen teruggevonden worden. Zo is er mogelijks een gedaalde expressie van CD64 op de monocytten, terwijl er ook een gedaalde expressie van CD65 op de uitrijpende neutrofielen kan voorkomen. Tevens kan men bij MDS een gedaalde expressie van zowel CD64 en CD65 terugvinden op CD34 + progenitorcellen. Al deze patronen zijn echter niet bij elke MDS aanwezig en bij de diagnose van MDS is het dus belangrijk om verschillende factoren (zoals cytomorfologie, kliniek, immunofenotype, ...) samen te interpreteren.

CD71/CD105

CD71 en CD105 zijn beide erythroïede markers. CD71 is een transferrine receptor proteïne dat een functie heeft bij de Fe-homeostase, met name met de Fe-inbouw in de cellen. Terwijl CD105 een endogline is dat een onderdeel vormt van het Transforming Growth Factor Beta complex en zo een rol heeft bij de vasculaire homeostase. (49-50)

Beide markers komen reeds vroeg tijdens de erythroïede uitrijping tot expressie en verdwijnen allebei eerder laat tijdens de uitrijping zodat beide markers bij de mature erythrocyt terug volledig verdwenen zijn. (Marsee et al. (2010) en Van der Velden et al. (2010)). (12,49)

Lammers et al. (2002) komt tot gelijkaardige resultaten en toont aan dat er bij Ep-CAM, een marker die vroeg tijdens de erythropoïese tot expressie komt, bijna altijd een co-expressie optreedt van zowel CD71 als CD105. Waardoor men kan concluderen dat beide antigenen een marker zijn voor de vroege erythropoïese en als marker voor erythroblasten kunnen dienen bij AML (cf. Bühring et al. (1999)). (51-52)

Ortolani beschreef ook een CD71+ immunofenotype bij acute erythroïede leukemie (type AML-6 volgens de FAB classificatie). (43)

Tevens bemerkte Della Porta et al. (2006) in een onderzoek waarbij de expressie bij 104 MDS patiënten vergeleken werd met deze bij 69 andere pathologieën en 19 gezonde controlestalen, dat er een stijging is van de CD105 expressie bij MDS en een daling van CD71 expressie. Ook werd er aangetoond dat er een stijging kan zijn van de H-ferritine expressie bij MDS. Deze bemerking leunt aan bij de bevinding dat er bij MDS vaak een Fe-overbelasting is van de erythroïede cellijn. Op basis van deze 3 markers (CD71, CD105 en H-ferritine) hebben Della Porta et al. (2006) een functie gemaakt waarmee de erythroïede dysplasie kan aangetoond worden (figuur 6). (53)

$$Y = 17.6476 \cdot \log(HF_{MFI}) - 2.8592 \cdot \log(CD71_{MFI}) + 14.0013 \cdot \log(CD105_{MFI}) - 19.1455.$$

Figuur 6: functie voor erythroïede dysplasie (53)

Bij een score > 0 is er sprake van erythroïede dysplasie terwijl een score van < 0 wijst op afwezigheid van erythroïede dysplasie. Deze score zou eventueel nuttig kunnen zijn bij de interpretatie van MDS. (53)

Della Porta et al. (2011) beschreef ook in een review enkele kenmerken die kunnen voorkomen bij MDS waaronder dus de stijging van CD105 expressie terug komt. Net zoals een gedaalde CD71 expressie in combinatie met een gestegen H-ferritine expressie. Ook een aberrante expressie van CD64 wordt beschreven (tabel 4). (54)

Table 1
Frequency and Reproducibility of Myeloid, Erythroid, and CD34-Related Abnormalities in MDS

Lineage	Immunophenotypic marker	Frequency in MDS	Frequency in controls	Analytical method
Myeloid	Reduction of SCC on granulocytes	10–85%	Single myeloid abnormality reported	Quantitative
	CD11b vs. CD16 and CD13 vs. CD16 maturation patterns	25–80%	in 30–40% of controls.	Qualitative
	Aberrant expression of CD64, CD10, CD56 and other on granulocytes	5–65%	Multiple abnormalities uncommon	Qualitative/quantitative
Erythroid	Dys-synchronous expression of CD71 vs. Gly A on erythroblasts	>70%	20–30%	Qualitative
	Increased H ferritin and reduced CD71 on erythroblast	>80%	About 20%	Quantitative
	Increased CD105 expression on erythroblasts	20–30%	Few data	Quantitative
CD34+ cell compartment	Increased CD34+ myeloblasts	20–40% of low risk MDS	5–10%	Quantitative
	Reduced CD34+ B cell progenitors	40–70%	20–40%	Quantitative
	Aberrant expression of CD45 on myeloblasts	20–40%	10–20%	Quantitative
	Reduced CD38 expression on myeloblasts	>80%	5–10%	Quantitative
	Aberrant expression of CD11b, CD15, CD56, CD4, CD7, and other on myeloblasts	5–80% Multiple abnormalities are common	5–10% Multiple abnormalities uncommon	Qualitative/quantitative

Tabel 4 naar Della Porta et al. (2011) (54)

Ondanks de recente innovaties is er over de verschillende nieuwe markers nog niet veel beschreven in de recente literatuur meer bepaald over hun gebruik in de flowcytometrische immunofenotypering voor hematologische neoplasieën. Uit deze literatuurstudie blijkt toch een zeker voorlopig overzicht over het potentieel gebruik voor deze markers. De 5 markers gebruikt in het B-CLPD panel zijn ook door het EuroFlow consortium voorgesteld en deze kunnen een mooie bijdrage leveren in de diagnostiek van de mature B-cel neoplasieën (tabel 5). (1)

Table 5. Mean MFI values per disease category in reference cases*

	WHO B-cell lymphoma entity							
	BL	CLL	DLBCL	FL	HCL	LPL	MCL	MZL
Marker:fluorochrome								
CD5:PerCP-Cy5-5	126	4589	229	114	255	217	2343	249
CD10:PE	4010	43	983	2333	1196	65	69	161
CD11c:PerCP-Cy5-5	121	311	995	87	11248	208	113	513
CD19:PE-Cy7	10405	10327	21405	5834	32609	13917	10936	21634
CD20:Pacific Blue	20764	4009	33038	22218	83954	25369	26696	37045
CD22:PerCP-Cy5-5	2561	1513	9167	3706	32976	2155	1989	5866
CD23:FITC	74	1744	316	248	374	819	152	595
CD27:APC	1068	1720	706	344	313	988	1306	1680
CD31:FITC	270	990	641	192	1870	602	696	849
CD38:APC-H7	8356	200	1882	1962	725	677	1128	1217
CD39:PE	77	1257	972	240	1576	553	1669	1478
CD43:APC-H7	1738	2488	814	281	1613	330	1512	534
CD45:PO	3177	3057	6374	4435	7944	5061	4445	6232
CD49d:APC-H7	580	170	735	745	1645	744	430	960
CD62L:FITC	67	467	323	309	515	551	279	181
CD79b:PerCP-Cy5-5	8912	396	10123	8339	6961	13369	10820	11310
CD81:APC-H7	11344	621	3313	4138	1598	1641	1789	2364
CD95:PE	231	170	1795	940	830	614	314	1986
CD103:FITC	56	85	102	55	1421	84	101	65
CD200:APC	89	4995	1355	816	8094	1315	75	1668
CXCR5:APC	2127	3305	1871	1327	1734	935	2193	1269
HLADR:PerCP-Cy5-5	8808	8684	16089	6689	7693	3671	7995	5335
IgM:APC	6902	172	2811	3882	497	2990	7603	5067
LAIR1:PE	162	611	283	88	12134	144	1310	233

* MFI values acquired using the final EuroFlow mature B-cell malignancy protocol as outlined in Table 4.

Tabel 5: Gemiddelde MFI per ziekte categorie in referentie casussen (I)

Over de nieuwe markers uit het AL-/MDS- panel is er in de literatuur tot op heden een beperkt aantal aan artikels verschenen. Het betreft weliswaar een topic waar men de laatste jaren meer onderzoek naar opgestart is. Voor de interpretatie van flowcytometrische resultaten van de heterogene groep MDS stelt men tot nu toe voornamelijk bepaalde patronen van afwijkingen in het normale expressiepatroon voor, die al dan niet aanwezig kunnen zijn in het immunofenotype van een MDS patiënt. Het is dus belangrijk om een overzicht te verkrijgen over alle verschillende patronen die op dysplasie in I van de 3 cellijnen zouden kunnen wijzen en die zich bijgevolg kunnen manifesteren bij MDS. Hiervoor is er nog meer literatuurstudie vereist, waarna men aan de hand van de potentiële afwijkende patronen kan nagaan of deze patronen ook terug te vinden zijn in onze resultaten. Om vervolgens in het Jessa laboratorium een eigenhandige lijst met mogelijke criteria te creëren die een zekere leidraad kunnen vormen bij het interpreteren van de flowcytometrische resultaten bij vermoeden van MDS.

3) Hoe verloopt de integratie in het Jessa Ziekenhuis van de gemodificeerde EuroFlowpanels op de 8-kleuren flowcytometer?

Na grondige selectie van de verschillende panels hebben we in het Jessa ziekenhuis besloten om te starten met de validatie van het B-CLPD panels en het PCD-panel, gezien deze twee pathologiegroepen het meest frequent voorkomen.

Eerst zijn we gestart met de instrument set-up, hierbij zo goed mogelijk rekening houdend met de adviezen en richtlijnen van het EuroFlow consortium in navolging van de standaardisatie van de instrumentinstellingen. We zijn gestart met het instellen van de EuroFlow configuratie. Vervolgens is er een baseline gedefinieerd met behulp van CS&T Beads (BD Biosciences). In een volgende fase hebben we een performance check uitgevoerd om de stabiliteit en validiteit van de baseline na te gaan. Daarna werden de PMT (photomultipliers tubes) voltages voor de doelwitkanalen van lichtverstrooiing ingesteld volgens de EuroFlow procedure. Deze laatste drie stappen moet gebeuren bij de installatie van het toestel, bij elk halfjaarlijks onderhoud en na elke dringende interventie. Vervolgens stelt men de fluorescentiecompensatie in met compensatiebeads. Dit moet gebeuren om te corrigeren voor fluorescentie "Spill over" van fluorochromen in andere detectoren dan deze waar het fluorochroom gemeten wordt. Door te compenseren wordt het fluorescentiesignaal van een fluorochroom verwijderd uit alle detectoren, behalve de detector waar het fluorochroom gemeten wordt. Een correcte compensatie is bijvoorbeeld essentieel om "dim" populaties te onderscheiden van negatieve populaties. Deze fluorescentiecompensatie moet uitgevoerd worden na aanpassing van de baseline, of na lotwijziging van monoklonalen met tandemfluorochromen PE-Cy7 en APC-H7 gezien dit minder stabiele fluorochromen zijn. Er werd besloten om 2 maal per week een controle van de instrumentinstellingen uit te voeren. Dit wordt gedaan door halfwekelijks een performance check te doen met CS&T Beads (BD Biosciences). Hierbij worden de instellingen automatisch geüpdatet met de FACSDiva software.

Daarna zijn we overgegaan tot de validatie voor het correct uitvoeren van flowcytometrische bepalingen. Hiervoor hebben we gebruik gemaakt van immuno-Trol controlecellen (Beckman Coulter) en BD Stem Cell Control Kit (BD Biosciences) voor de bepaling van respectievelijk de lymfocytensubsets en de CD34+ hematopoïetische stamcellen te valideren. Dit werd gedaan door de within sample precisie, between sample precisie of repeteerbaarheid en de between day precisie of reproduceerbaarheid na te gaan. Deze resultaten lagen allemaal binnen de vooropgestelde criteria. Hieropvolgend hebben we een correlatie uitgevoerd tussen de verschillende flowcytometers.

Vervolgens hebben we de validatie uitgevoerd van de diagnostische juistheid van de nieuwe gemodificeerde EuroFlowpanels op de 8-kleuren FACSCanto II (BD Biosciences). Zoals eerder vermeld hebben we dit reeds voltooid voor het B-CLPD panel en voor het PCD-panel.

Voor deze validatie hebben we enkele stalen dubbel geanalyseerd, éénmaal met de huidige in-house panels op de "oude" flowcytometers en éénmaal met de nieuwe gemodificeerde EuroFlowpanels op de 8-kleuren FACSCanto II (BD), waarbij deze resultaten vergeleken zijn op basis van overeenkomst in diagnose. Er werd steeds dezelfde diagnose gesteld met de resultaten bekomen aan de hand van de 2 afzonderlijke analysemethoden. Uit deze validatie kon besloten worden dat men voor deze panels de verandering naar de nieuwe techniek kon invoeren en er werd besloten om op 02/01/2012 te starten met het gebruik van de gemodificeerde EuroFlowpanels voor de diagnostiek en follow-up van mature B-cel en plasmacel neoplasieën.

De volgende stap bestaat uit de validatie van het T-CLPD panel, het NK-CLPD panel en het AL-/MDS-panels. Voor de validatie van het acuut-/MDS-panel is eventueel nog meer literatuuronderzoek nodig naar de specifieke afwijkingen die zich allemaal kunnen voordoen bij een MDS.

4) Zien we reeds veranderingen, al dan niet positief of negatief van aard?

Ondertussen zijn we gestart met het in gebruik nemen van het B-CLPD panel en het PCD-panel in de routine sinds 02/01/2012. De resultaten zijn overzichtelijk en gemakkelijk te interpreteren. Na een periode van 2 maanden kunnen we het gebruik van de nieuwe gemodificeerde panels in de routine aan een eerste evaluatie onderwerpen. De volgende bemerkingspunten kunnen gemaakt worden:

- Bij de evaluatie voor het invoeren van de (gemodificeerde) EuroFlow panels en de standaardisatie is er de vraagstelling gerezen of er door de invoering van een oriënteringsbuis (LSTb-buis) een daling kan optreden van het aantal markers, die per patiënt geanalyseerd moeten worden. Er wordt immers bij vermoeden van een mature B-cel neoplasie op basis van de anamnese en het klinisch onderzoek vanuit de kliniek regelmatig flowcytometrie op perifeer bloed, beenmerg of klierweefsel aangevraagd om deze pathologie uit te sluiten of te bevestigen. Bij deze aanvragen werd bij de vroegere in-house panels in één fase onmiddellijk 27 markers ingezet. Dit in tegenstelling tot de nieuwe methode waarbij er gestart wordt met een oriënteringsbuis, die 11 antistoffen bevat. Uit de resultaten van deze oriënteringsbuis kan men de aanwezigheid van een monoklonale neoplasie

bevestigen of uitsluiten en zo beslissen of er een bijkomend antistofpanel moeten ingezet worden voor classificatie. Indien er via de oriënteringsbuis kan aangetoond worden dat er geen hematologische neoplasie aanwezig is, heeft men dus slechts 11 antistoffen moeten gebruiken voor het specifieke staal. Hierdoor worden de kosten voor de patiënt en voor de maatschappij verminderd, wat in deze periode van besparingen in de medische sector zeker als een voordeel kan beschouwd worden. Concreet zijn we over een periode van 10 weken (02/01/2012 tem 09/03/2012) nagegaan welke panels er bij elk staal ingezet zijn. Hieruit bleek dat er bij 46.6% van de stalen met vraag naar een mature B-cel neoplasie, geen hematologische neoplasie aangetoond kon worden op basis van de LSTb-buis, en is men dus gestopt met de verdere analyse. Daarnaast verlaagt de hands-on-time tijd. Want gezien er minder antistoffen ingezet dienen te worden moet men ook minder antistoffen pipetteren en duurt de preanalytische fase minder lang.

- Een bijkomend voordeel van het gebruik van de oriënteringsbuis bestaat in het feit dat men, gezien elk staal start met de LSTb-buis, bij aankomst van meerdere stalen een mix van de antistoffen kan maken die men vervolgens verdeeld over de verschillende stalen. Dit bespaart ook actieve hands-on-time tijd op de werkplaats en heeft dus ook een kostenverlagend effect. Gezien het grote aanbod van stalen in het Jessa Ziekenhuis kan dit voordelig werken door de werkdruk te verlagen.
- De medisch laboratorium technoloog is nauwer betrokken bij de interpretatie van de resultaten door het gebruik van de oriënteringsbuis. Men moet na de analyse van deze LSTb-buis reeds een snelle interpretatie uitvoeren om indien nodig een bijkomend panel in te zetten. Bij twijfel kan men altijd een klinisch bioloog contacteren, maar de zelfstandige voorlopige eerste interpretatie wordt positief ervaren door de laboranten aangezien ze gestimuleerd worden om meer actief bij het proces betrokken te zijn. Bij navraag op de werkvloer blijkt dat de invoer van de nieuwe panels positief ervaren worden en dat deze manier van werken de motivatie verhoogt.
- De LSTb-buis heeft een zeer ruim diagnostisch spectrum. Na de oriëntering heeft men ook reeds informatie over een mogelijke plasmacelafwijking en over een mogelijke T- of NK-cel afwijking.
- Voor de interpretatie van mature B-cel neoplasieën is de aanwezigheid van monokonaal surface kappa of lambda een belangrijke beoordelingsparameter die bij de interpretatie van de flowcytometrische immunofenotypering bekeken wordt. Echter bij mature B-cel neoplasieën is de expressie van dit surface kappa of lambda net regelmatig gedaald, dus is het belangrijk dat men hiervoor goede antistofmarkers, met een zo goed mogelijke binding, gebruikt. In de nieuwe antistofpanels maakt men nu gebruik van reagens met polykonaal kappa en lambda in de oriënteringsbuis, in tegenstelling tot het monokonaal kappa en lambda dat voorheen gebruikt werd. Dit reagens blijkt een betere binding te vertonen dan het eerder gebruikte reagens met monokonaal kappa en lambda. Hierdoor blijken de resultaten meer significant te zijn.
- Op vlak van kostenefficiëntie moeten we echter nog een grondige evaluatie uitvoeren. Er zijn enkele aspecten die we al kunnen aanhalen. Er zijn namelijk regelmatig minder antistoffen nodig door het gebruik van een oriënteringsbuis, wat toch een voordeel blijkt van het meerfasen principe in de flowcytometrische immunofenotypering van hematologische neoplasieën. Verder kan men echter wel aanhalen dat enkele van de door EuroFlow voorgestelde antistof-fluorochroom combinaties een duurdere aankoop prijs hebben. De kostenefficiëntie voor het laboratorium, voor de patiënt en voor de maatschappij moet nog verder geëvalueerd worden. Het is hierbij belangrijk dat de andere antistofpanels ook bij deze evaluatie mee geëvalueerd kunnen worden.

Na deze eerste evaluatie kan men concluderen dat er vooral positieve opmerkingen zijn bij het gebruik van de gemodificeerde EuroFlow panels in de routine. Verdere evaluatie na een langere periode moet zeker nog volgen, zeker ook na het invoeren van het T-CLPD en NK-CLPD panel en het AL-/MDS-panel. Tevens zal het opstarten van de INFINCYT software nog de nodige opleiding, ervaring en aandacht vereisen in de komende maanden.

To DO/ACTIONS

- 1) Opstarten (na validatie) van het AL-/MDS-panel en het T-LPCD en NK-LPCD panel.
- 2) Potentiële richtlijnen/criteria ontwikkelen voor de interpretatie van MDS via flowcytometrie.
- 3) Data analyse via de INFINCYT software leren gebruiken.
- 4) Opstellen en opstarten van PNH op de 8-kleuren flowcytometer volgens de Clinical Cytometry Society (CCS) guidelines.

ATTACHMENTS

Attachment I

Zie <http://www.euroflow.org/new-protocols.php>

- Detailed EuroFlow Standard Operating Procedures (SOPs) for sample preparation and staining
- EuroFlow Standard Operating Protocol (SOP) for Instrument Setup and Compensation

Attachment 2

EuroFlow Antibody Panels (17)



ALOT- Acute Leukemia Orientation Tube

Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
CyCD3	CD45	CyMPO	CyCD79a	CD34	CD19	CD7	SmCD3

LST-Lymphoid Screening Tube

Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
CD20 and CD4	CD45	CD8 and SmlgA	CD56 and Smlgk	CD5	CD19 and TCR $\gamma\delta$	SmCD3	CD38

SST- Small Sample Tube

Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
CD20	CD45	CD8 and SmlgA	CD56 and Smlgk	CD4	CD19	SmCD3 and CD14	CD38

PCD- Plasma Cell Dyscrasias Panel

Tube	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Aim
1	CD45	CD138	CD38	CD56	$\beta 2$ micro	CD19	CyIgc	CyIgi	Detection of aberrant and clonal plasma cells
2	CD45	CD138	CD38	CD28	CD27	CD19	CD117	CD81	Complementary phenotypic characterization and evaluation of markers with potential prognostic impact

BCP-ALL (B-cell Precursor ALL) Panel

Tube	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Aim
1	CD20	CD45	CD58	CD56c	CD34	CD19	CD10	CD38	Diagnosis and classification of BCP-ALL; Detection of LAP markers; Detection of phenotypes associated with molecular aberrations
2	Smlgk	CD45	CyIga	CD33	CD34	CD19	Smlga and CD117	Smlgi	Diagnosis and classification of BCP-ALL
3	CD9	CD45	NuTdT	CD13	CD34	CD19	CD22	CD24	Diagnosis and classification of BCP-ALL; Detection of phenotypes associated with molecular aberrations; Detection of LAP markers
4	CD21	CD45	CD15 and CDw65	NG2	CD34	CD19	CD123	CD81	Subclassification of BCP-ALL; Detection of LAP markers; Detection of phenotypes associated with molecular aberrations

T-ALL (T-cell ALL) Panel

Tube	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Aim
1	CyCD3	CD45	NuTdT	CD99	CD5	CD10	CD1a	SmCD3	Diagnosis of T-ALL, classification of T-ALL, and determine the maturation stage of arrest; Identification of LAP markers
2	CyCD3	CD45	CD2	CD117	CD4	CD8	CD7	SmCD3	Diagnosis of T-ALL, classification of T-ALL, and determine the maturation stage of arrest; Identification of LAP markers
3	CyCD3	CD45	TCR $\gamma\delta$	TCR $\alpha\beta$	CD33	CD56	CyTCRp	SmCD3	Diagnosis of T-ALL and determine the maturation stage of arrest; Identification of LAP markers
4	CyCD3	CD45	CD44	CD13	HLADR	CD45RA	CD123	SmCD3	Subclassification of T-ALL

AML /MDS (Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes) Panel

Tube	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Aim
AML/MDS									
1	HLADR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10	Diagnosis and subclassification of AML and PNH especially focused on neutrophilic lineage
2	HLADR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	IREM2	CD14	Diagnosis and subclassification of AML and PNH especially focused on monocytic lineage
3	HLADR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71	Diagnosis and subclassification of AML especially focused on erythroid lineage
4	HLADR	CD45	NuTdT	CD56	CD34	CD117	CD7	CD19	Aberrant expression of lymphoid associated markers and abnormal lymphoid maturation
AML									
5	HLADR	CD45	CD15	NG2	CD34	CD117	CD22	CD38	Aberrant expression of markers; Detection of stem cells
6	HLADR	CD45	CD42a and CD61	CD203c	CD34	CD117	CD123	CD4	Diagnosis and subclassification of AML especially focused on megakaryocytic basophilic, and plasmacytoid dendritic lineages
AML-M7									
7	HLADR	CD45	CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9	Characterization of AML-M7, mastocytosis

B-CLPD (B-cell Chronic Lymphoproliferative Diseases) Panel

Tube	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Aim
1	CD20 and CD4	CD45	CD8 and SmlgA	CD56 and Smlgk	CD5	CD19 and TCR $\gamma\delta$	SmCD3	CD38	LST tube; Detection of B-CLPD
2	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43	Identification of CLL vs other B-CLPD cases, when combined with LST
3	CD20	CD45	CD31	LAIR1	CD11c	CD19	Smlg μ	CD81	Further subclassification of non-CLL BCLPD (e.g. HCL, MCL, FL, MZL, LPL, DLBCL and other B-CLPD)
4	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CXCR5	CD49d	
5	CD20	CD45	CD82L	CD39	HLADR	CD19	CD27		

B-CLPD Limited (B-cell Chronic Lymphoproliferative Diseases) Panel

Tube	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Aim
1	CD20 and CD4	CD45	CD8 and SmlgA	CD56 and Smlgk	CD5	CD19 and TCR $\gamma\delta$	SmCD3	CD38	LST tube; Detection of B-CLPD
2	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43	Identification of CLL vs other B-CLPD cases, when combined with LST

T-CLPD (T-cell Chronic Lymphoproliferative Diseases) Panel

Tube	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Aim
1	CD4	CD45	CD7	CD26	SmCD3	CD2	CD28	CD8	Phenotypic characterization; Identification of Sezary syndrome
2	CD4	CD45	CD27	CCR7	SmCD3	CD45RO	CD45RA	CD8	Phenotypic characterization; Assessment of maturation stage
3	CD4	CD45	CD5	CD25	SmCD3	HLADR	CyTCL1	CD8	Phenotypic characterization; Identification of T-PLL
4	CD4	CD45	CD57	CD30	SmCD3		CD11c	CD8	Phenotypic characterization; Cytotoxic phenotype and identification of anaplastic T-cell lymphoma
5	CD4	CD45	CyPerforin	CyGranzyme	SmCD3	CD16	CD94	CD8	Phenotypic characterization; Assessment of cytotoxic associated phenotypes; Identification of T-LGL
6	CD4	CD45		CD279	SmCD3			CD8	Identification of lymphomas derived from follicular helper T cells (angioimmunoblastic T-cell lymphomas)

NK-CLPD (NK-cell Chronic Lymphoproliferative Diseases) Panel

Tube	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Aim
1	CD2	CD45	CD7	CD26	SmCD3	CD56	CD5	CD19	Detection of aberrant NK cell phenotype
2	CD16	CD45	CD57	CD25	SmCD3	CD56	CD11c	CD19	Detection of aberrant NK cell phenotype
3	HLADR	CD45	CyPerforin	CyGranzyme	SmCD3	CD56	CD94	CD19	Detection of aberrant NK cell phenotype; Assessment of cytotoxic effector phenotype

Attachment 3

Nieuwe antistofpanelen in het Jessa laboratorium

DIAGNOSE

B-CLPD

	HV450	HV500	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
LSTb <i>(wassen)</i>	CD20 2.5 µL CD4 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD8 10 µL SmlgL 5 µL	CD56 10 µL SmlgK 5 µL	CD5 10 µL	CD19 2.5 µL	SmCD3 2.5 µL	CD38 2.5 µL

Indien monoclonale B-cellen:

	HV450	HV500	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
CLPD2	CD20 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD23 10 µL	CD10 10 µL	CD79b 10 µL	CD19 2.5 µL	CD200 2.5 µL	CD43 2.5 µL
IGH	FMC7 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD38 10 µL	SmlgD 10 µL	CD22 10 µL	CD19 2.5 µL	SmlgM 2.5 µL	CD81 2.5 µL

Indien CD5 - :

	HV450	HV500	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
HCL	CD20 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD103 10 µL	LAIR1 10 µL	CD11c 10 µL	CD19 2.5 µL	SmlgG 2.5 µL	CD25 2.5 µL

PCD

	HV450	HV500	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
LSTb	CD20 2.5 µL CD4 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD8 10 µL SmlgL 5 µL	CD56 10 µL SmlgK 5 µL	CD5 10 µL	CD19 2.5 µL	SmCD3 2.5 µL	CD38 2.5 µL
PCD <i>(A&B)</i>	CD20 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD38 10 µL	CD56 10 µL	CD138 10 µL	CD19 2.5 µL	CyIgK 2.5 µL	CyIgL 2.5 µL

Indien monoclonale plasmacellen:

	HV450	HV500	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
sorteer <i>(A&B)</i>			CyIgK/CyIgL 50 µL		CD138 50 µL	CD56 3 µL	CD38 12.5 µL	

(in validatie)

T&NK-CLPD

	HV450	HV500	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
LSTb † <i>(wassen)</i>	CD20 2.5 µL CD4 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD8 10 µL SmlgL 5 µL	CD56 10 µL SmlgK 5 µL	CD5 10 µL	CD19 2.5 µL TCRgd 2.5 µL	SmCD3 2.5 µL	CD38 2.5 µL
T	HLADR 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD7 10 µL	CD1a 10 µL	CD5 10 µL	CD2 2.5 µL	SmCD3 2.5 µL	CD25 2.5 µL
NK	CD16 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD57 10 µL	CD56 10 µL	CD5 10 µL	CD19 2.5 µL	SmCD3 2.5 µL	CD8 2.5 µL

(in validatie)

AML/MDS/BCP-ALL/T-ALL

	HV450	HV500	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
LSTb (wassen)	CD20 2.5 µL CD4 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD8 10 µL SmIgL 5 µL	CD56 10 µL SmIgK 5 µL	CD5 10 µL	CD19 2.5 µL	SmCD3 2.5 µL	CD38 2.5 µL
AL	HLADR 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD15 2.5 µL CD65 10 µL	CD34 10 µL	CD19 10 µL	CD117 2.5 µL	CD33 2.5 µL	CD10 2.5 µL
MDS1	HLADR 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD16 10 µL	CD13 10 µL	CD34 10 µL	CD117 2.5 µL	CD11b 2.5 µL	CD10 2.5 µL
MDS2	HLADR 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD35 10 µL	CD64 10 µL	CD34 10 µL	CD117 2.5 µL	/	CD14 2.5 µL
MDS3	HLADR 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD36 10 µL	CD105 10 µL	CD34 10 µL	CD117 2.5 µL	CD33 2.5 µL	CD71 2.5 µL
ALOT (A&B)	CyCD3 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CyMPO 10 µL	CyCD79a 10 µL	CD34 10 µL	CD19 2.5 µL	CD7 2.5 µL	SmCD3 2.5 µL
ALBT (A&B)	HLADR 2.5 µL	CD45 2.5 µL	nuTdT 10 µL	CD10 10 µL	CD34 10 µL	CD19 2.5 µL	CD22 2.5 µL	CD38 2.5 µL
AL67	HLADR 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD61 10 µL	CD235a 10 µL	CD34 10 µL	CD117 2.5 µL	CD41 2.5 µL	CD4 2.5 µL

FOLLOW-UP

B-CLPD

	HV450	HV500	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
LSTb <i>(wassen)</i>	CD20 2.5 µL CD4 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD8 10 µL SmlgL 5 µL	CD56 10 µL SmlgK 5 µL	CD5 10 µL	CD19 2.5 µL	SmCD3 2.5 µL	CD38 2.5 µL

Indien <3% monoclonale B-cellen en CD5+:

	HV450	HV500	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
ERIC <i>(MRD)</i>	CD20 5 µL	CD45 5 µL	CD81 20 µL	CD22 20 µL	CD79b 20 µL	CD19 5 µL	CD5 5 µL	CD43 5 µL

Indien <3% monoclonale B-cellen en CD5- (niet HCL, HCLv en SLVL):

	HV450	HV500	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
CLPD2 <i>(MRD)</i>	CD20 5 µL	CD45 5 µL	CD23 20 µL	CD10 20 µL	CD79b 20 µL	CD19 5 µL	CD200 5 µL	CD43 5 µL

Indien <3% monoclonale B-cellen en HCL, HCLv of SLVL:

	HV450	HV500	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
HCL <i>(MRD)</i>	CD20 5 µL	CD45 5 µL	CD103 20 µL	LAIR1 20 µL	CD11c 20 µL	CD19 5 µL	SmlgG 5 µL	CD25 5 µL

PCD

	HV450	HV500	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
LSTb	CD20 2.5 µL CD4 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD8 10 µL SmlgL 5 µL	CD56 10 µL SmlgK 5 µL	CD5 10 µL	CD19 2.5 µL	SmCD3 2.5 µL	CD38 2.5 µL
PCD <i>(A&B)</i>	CD20 2.5 µL	CD45 2.5 µL	CD38 10 µL	CD56 10 µL	CD138 10 µL	CD19 2.5 µL	CyIgK 2.5 µL	CyIgL 2.5 µL

Versie 080820: aanpassing sjabloon

Revisie 090827: geen wijzigingen