

# Laboratorní diagnostika hematoonkologických malignit – průtoková cytometrie

Marek Borský  
Laboratoř průtokové cytometrie, CMBG, IHOK

## Část II

- Akutní leukémie
- MDS a PNH
- B lymfoproliferace

# Přínos FCM pro hematologii

## ZÁSADNÍ VÝZNAM

stanovení diagnózy, „staging“ , MRD

**ALL, CLL, AML, MM, HCL, PLL, MCL**

## OMEZENÝ VÝZNAM

přispívá ke stanovení diagnózy

**další NHL, LGL, MF/SS**

## BEZ VÝZNAMU

nelze stanovit diagnózu, odhalit patologii

**HL, CML**



Pacient: ..... muž - žena  
 ČP: ..... datum nar.: ..... ZP: .....  
 Kontakt na pac.: ..... Číslo dg.: .....  
 Zdrav. zařízení: ..... ☎

lab. číslo:
dodáno/převzal:
poznámka:

**Materiál**  *je infekční!*

- periferní krev
- kostní dřeň
- biopsie: .....
- separované PBSC
- DLI
- BAL
- mozkomíšni mok
- nádorová tkáň
- jiný .....

**Požadované vyšetření průtokovou cytometrií**

- imunofenotypizace lymfocytů:  T  T+B  T+B+NK  BAL  
 CD34<sup>+</sup>  cPerforin (HLH)  imunofenotypizace trombocytů\*  
hematoonkologická dg.:\*

- screening:  základní  lymfo/myeloprol.  
 diferenciální dg.:  AL  NHL  B-klonalita  T-klonalita  
 diagnóza:  AML  MDS  PNH  T-ALL  B-ALL  
 B-CLL  CLL-MRD\*  HCL  MM  
 B-NHL  MCL  MCL-MRD\*  
 T-NHL  PTL  MF/SS  LGL

Léčba

- antibiotika  cytostatika  
 kortikoidy  imunosupresiva

↑ Tyto údaje vyplňuje laboratoř.

**Datum a čas odběru** Ⓞ

Transplantace KD

- auto  allo

Transfuze (datum posledního podání!.....)

- ERY  TRC  LEU  MRD\*  staging\*  restaging\*  cell sorting

Klinické informace:	Dg. slovy:	razítko zdravotnického zařízení
	Cíl vyšetření?	razítko a podpis lékaře

2-164/23/4

# B-ALL – akutní B-lymfoblastická leukémie

- Infiltrace KD, PK klonálními blastickými buňkami B-linie
- Fenotyp blastů v kombinaci s cytogenetikou má nezávislý prognostický význam
- Pro-B-ALL (B-I) – nejméně zralý typ CD10<sup>neg</sup>

typický imunofenotyp: CD10-34+19+20-22-c22+c79a+clgM-slg-cTdT+

- Common ALL (B-II) – zralejší typ CD10+

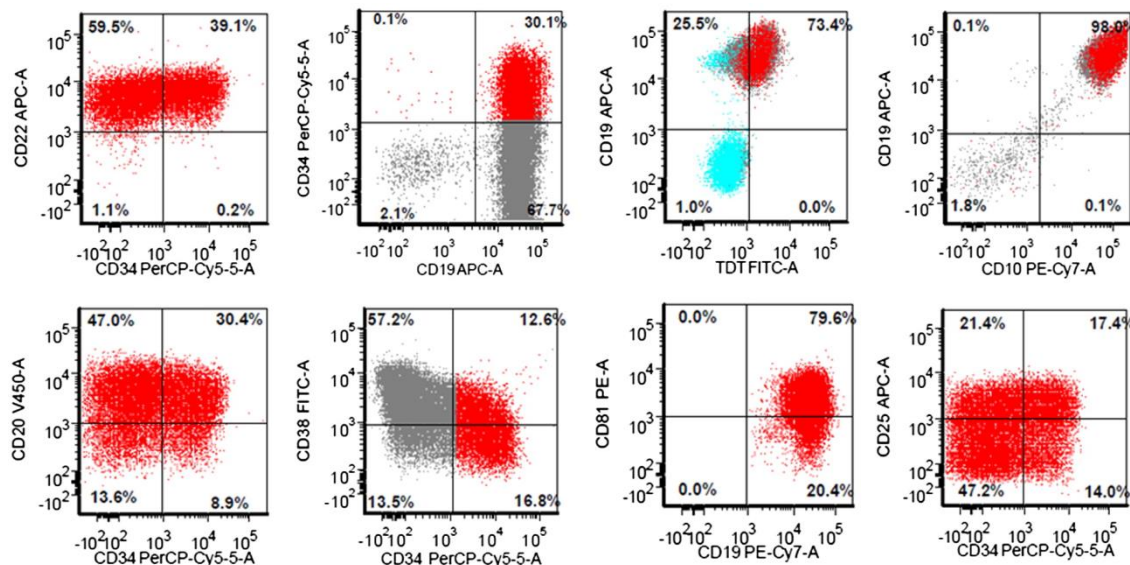
typický imunofenotyp: CD10+34+/-19+20-/+22-/+c22+c79a+clgM-slg-cTdT+

- Pre-B-ALL (B-III) – zralejší typ clgM+

typický imunofenotyp: CD10+34-/+19+20+22+/-c22+c79a+clgM+slg-cTdT+

- Zralá B-ALL (B-IV) – slg+cTdT-

Příklad FCM analýzy B-III



# B-ALL – MRD

- Vstupní FCM analýza musí být schopná odlišit leukemické blasty od fyziologických B-prekursorů a dalších malignit např. fenotypově blízký - FL folikulární lymfom (CD5-10+20++45+)
- Výskyt aberantních znaků (např. CD13, CD66c, CD123) a asynchronní exprese umožňuje stanovit specifický LAIP (leukemia-associated immunophenotype) a následně vyšetřovat MRD dle individuálního panelu

Příklad vyšetřovacích panelů EuroFlow pro B-ALL:

BCP-ALL	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
FITC	CD15+65	clgM	CD2	CD81
PE	CD66c	sIgM	NG2	CRLF2
PerCP	CD34	CD34	CD34	CD34
PE-Cy7	CD19	CD19	CD19	CD19
APC	CD10	sIgλ	CD22	CD123
APC-Cy7	CD20	sIgκ	CD24	CD13
PB	CD304	CD73	CD9	CD21
PO	CD45	CD45	CD45	CD45

Příklad vyšetřovacích panelů MRD pro B-ALL:

MRD	B-ALL	B-ALL	B-ALL
	CD66c/123	CD22	cTdT
FITC	CD123	CD123	cTdT
PE	CD66c	CD19	CD19
PerCP	CD34	CD34	CD34
PE-Cy7	CD19	CD22	CD10
APC	CD10	CD10	CD123
APC-Cy7	CD13	CD20	CD20
PB	CD304	HLA-DR	HLA-DR
PO	CD45	CD45	CD45

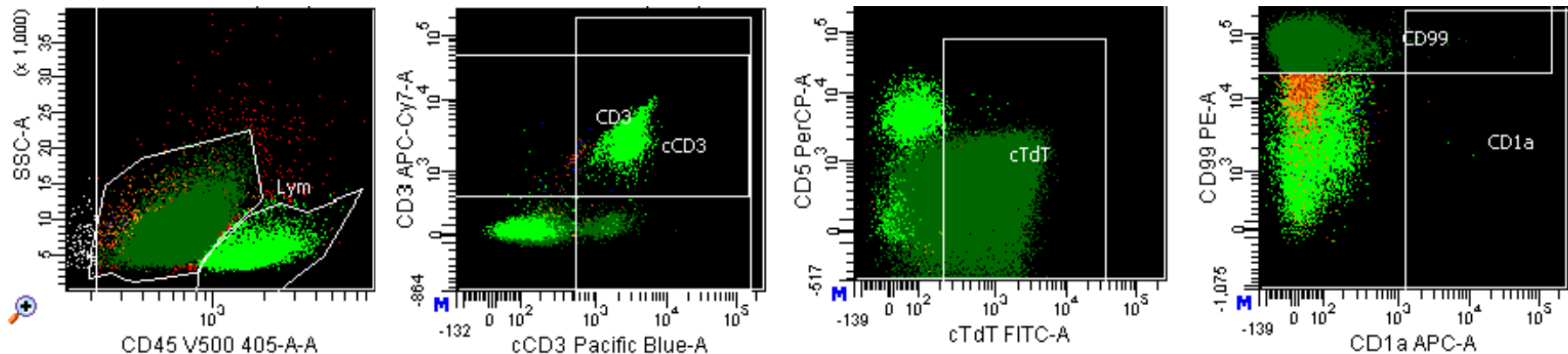
# T-ALL – akutní T-lymfoblastická leukémie

- Infiltrace KD, PK klonálními blastickými buňkami T-linie
- Typická je dysregulovaná exprese pan T-lymfoidních znaků (CD2, CD5 a CD7)
- Pro-T-ALL (T-I) – cCD3+CD7+2-5-8-1a-
- Pre-T-ALL (T-II) – cCD3+CD2+ a/nebo CD5+ a/nebo CD8+1a-
- Kortikální T-ALL (T-III) – CD1a+cCD3+/-
- Zralá T-ALL (T-IV) – CD3+TCR+CD1a-

Příklad vyšetřovacích panelů EuroFlow pro T-ALL:

T-ALL	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
FITC	cTdT	CD2	TCR $\gamma\delta$	CD44
PE	CD99	CD117	TCR $\alpha\beta$	CD13
PerCP	CD5	CD4	CD33	HLA-DR
PE-Cy7	CD10	CD8	CD56	CD45RA
APC	CD1a	CD7	CD7	CD123
APC-Cy7	CD3	CD3	CD3	CD3
PB	cCD3	cCD3	cCD3	cCD3
PO	CD45	CD45	CD45	CD45

Příklad T-ALL (T-I) – tmavá populace



# AML – akutní myeloidní leukémie

- Heterogenní skupina bez typického imunofenotypu
- Infiltrace KD, PK blastickými/prekurzorovými buňkami myeloidního původu
- Častý výskyt aberantních znaků a asynchronní exprese
- Úlohou FCM je potvrzení myeloidního původu patogenních buněk a stanovení jejich podtypu spolu s LAIP, který lze použít pro MRD
- Individuální vyšetřovací panely (až 30 znaků - nákladné)
- Příklad výsledku FCM:

*Myeloidní blasty CD7-13+14-15-/+33+34+/-38+56-64-/+79a-117-/+123dim371-/+DR+ tvoří cca 25 % z leukocytů. Dg. AML. MRD nelze hodnotit.*

Příklad aberantních znaků u některých podtypů AML a další expresní abnormality

AML type	CD34	Aberrant expression	Positive/strong expression	Weak/absent expression
AML with t(8;21)	+	CD19, cCD79a, CD56	HLA-DR, MPO, CD13	CD33
AML inv(16) or t(16;16)	+	CD2	CD117	
APL with t(15;17)	-	CD56		HLA-DR, CD15, CD65
AML with mutated <i>NPM1</i>	-		CD13, CD117, CD123	HLA-DR
AML with mutated <i>CEBPA</i>	+	CD7	CD13, CD33, HLA-DR, CD15	CD14

# AML – MRD

- MRD lze FCM vyšetřit pouze u AML M0-2 (výjimečně M4,5)
- Nutné vstupní vyšetření KD, kdy hledáme vhodný LAIP patologické populace
- Pokud je LAIP nalezen = MRD lze hodnotit na hladině citlivosti 0,1 %
- AML LAIP nenalezen = hledáme DfN (different from normal) LAIP (citlivost kolísá mezi 0,2 – 3 %)
- Lze také použít LAIP na leukemických kmenových buňkách (LSC)

## Postup:

- Vstupní vyšetření KD (určen imunofenotyp pro následné MRD)
- Následné MRD vyšetření KD (základní panel + individuální panel dle LAIP)
- Srovnání velikosti sledované zbytkové populace s LAIP a fyziologické hladiny (vyzrávání KD)
- Hodnocení

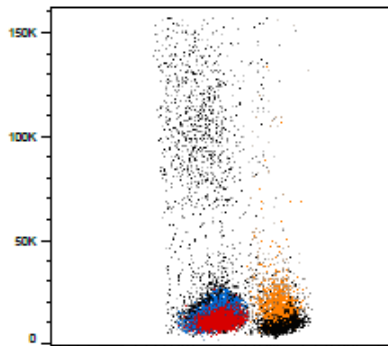
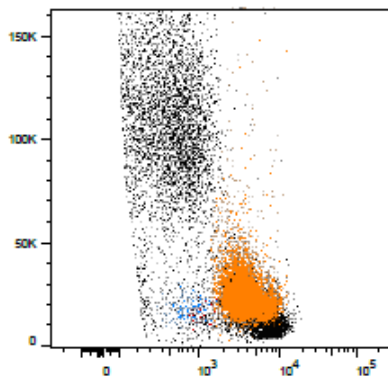
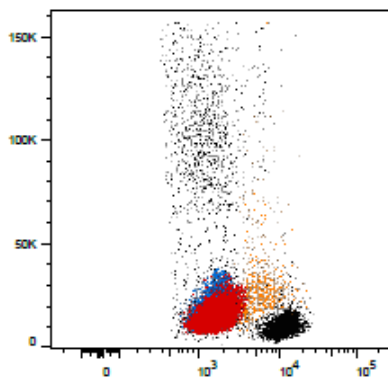


# AML - MRD

CD45dim14-(Bla)

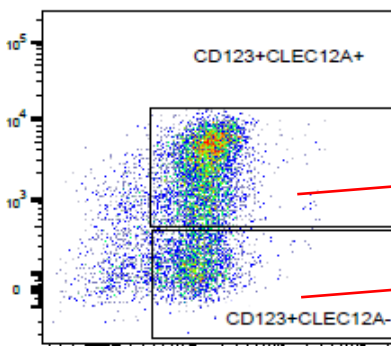
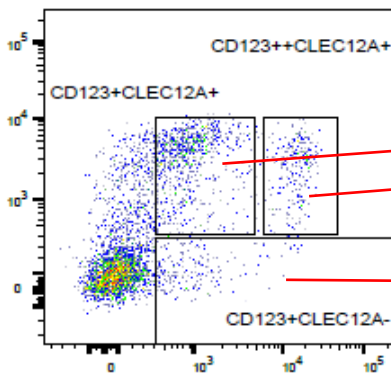
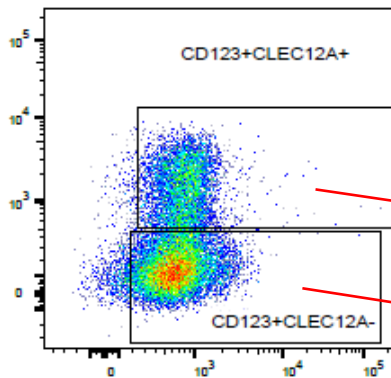
LAIP1 = CD34+123+CLEC12A-  
LAIP2 = CD34+123+CLEC12A+

SSC-A



CD45

CLEC12A



CD123

## AT DIAGNOSIS

CD13+14-33-/ +34+38-117+123dim+  
HLA-DR+CLEC12A-/ +cMPO-/ +cTdT-/ +

(cutoff = 0.2%)

(cutoff = 0.1%)

## MRD NEGATIVE

0.19% (cutoff = 0.2%)

0.06% (cutoff = 0.1%)

0.1% (cutoff = 0.1%)

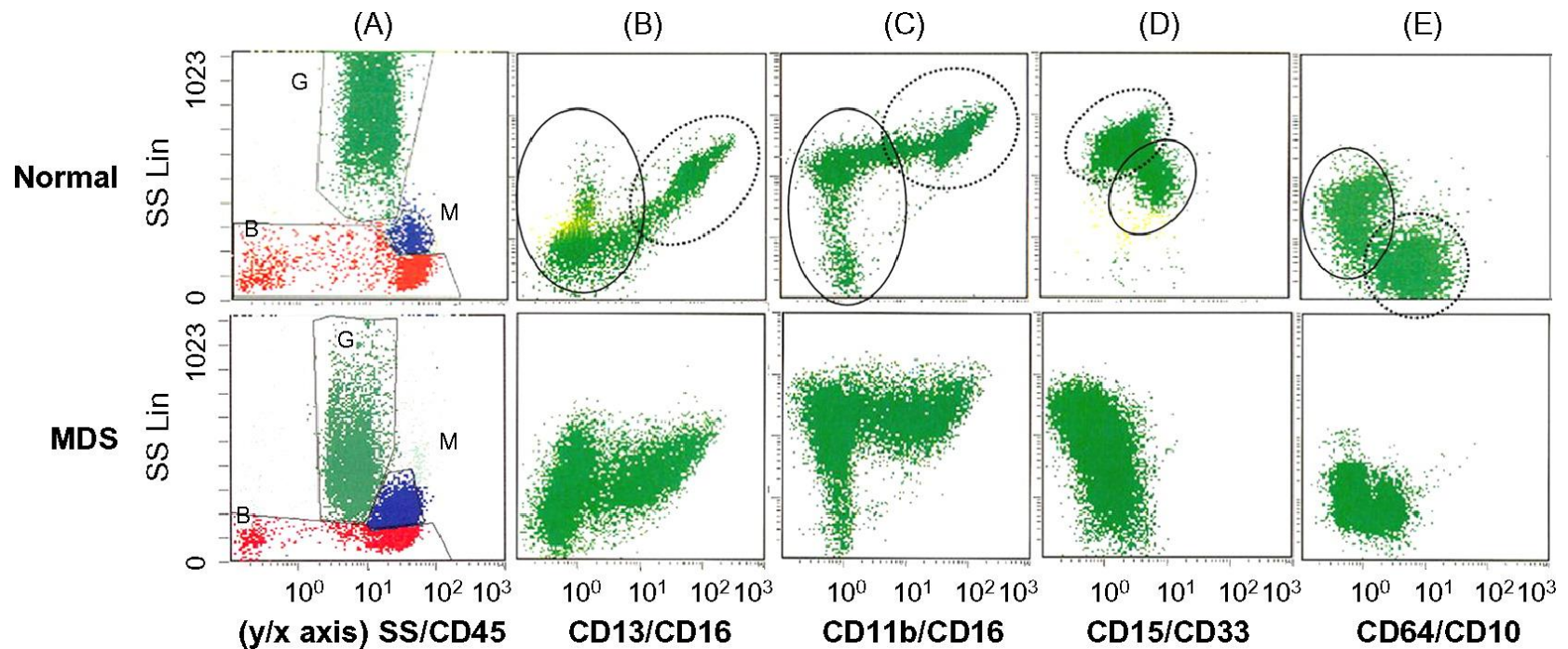
## MRD POSITIVE

10% (cutoff = 0.2%)

4% (cutoff = 0.1%)

# MDS – myelodysplastický syndrom

- <20 % blastické komponenty (často CD34+) v KD
- Dysplastické změny v jednotlivých krevních řadách jsou doprovázeny změnami exprese určitých znaků nebo jejich aberací
- Dysplastické změny granulocytů – snížený SSC (kompaktnější jádra)
- Dyserythropoéza – snížení CD71 na erytroidních prekurzorech
- Dysplastické monocyty – aberantní exprese CD56



# PNH – paroxysmální noční hemoglobinurie

- Vzácná, nevyléčitelná, život ohrožující, získaná, přidružující se k AA a MDS
- mutace v genu PIGA (chromozom X) -> porušení biosyntézy GPI kotvy -> nezakotvení některých proteinů (CD55, CD59) v plazmatické membráně
- nepřítomnost CD55 a CD59 proteinů na povrchu Ery (CD46neg) -> atak komplementu -> rozpad Ery -> anémie
- volný hemoglobin a hém v plazmě inhibuje oxid dusný (klíčový regulátor relaxace hladkého svalstva) -> spasmus malých cév -> bolest, erektilní dysfunkce
  
- FCM – detekce PNH klonů na Ery, Neu a Mono
- Kombinace GPI zakotvených proteinů (CD59, 14, 24) a anti-GPI sondy (Flaer)
- PNH klon se vyznačuje sníženou expresí GPI a současně některého GPI zakotveného znaku
- Potvrzením přítomnosti PNH klonu je pozitivní nález na Ery + na Neu nebo Mono
- Podání erymasy maskuje přítomnost PNH klonu na Ery!

# Vyšetření přítomnosti PNH klonů průtokovou cytometrií - zkumavka RBC

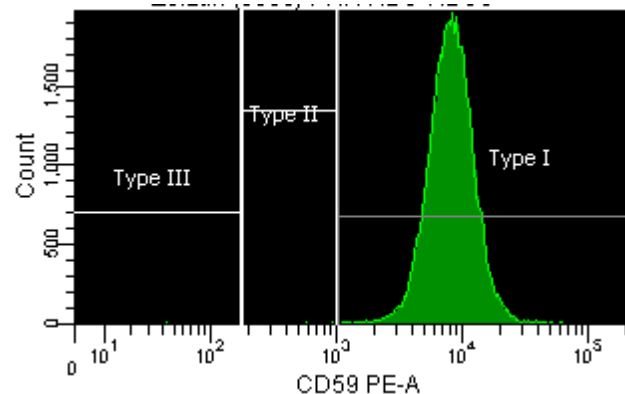


zkumavka **RBC** – anti-CD235a –FITC  
anti-CD59-PE

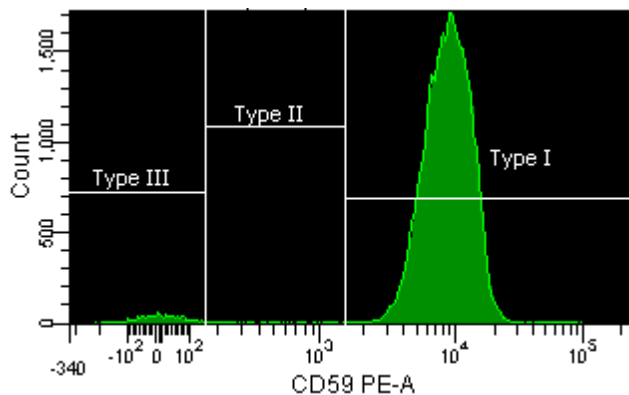
Analýza na 150 000 Ery.

Citlivost 0,01%

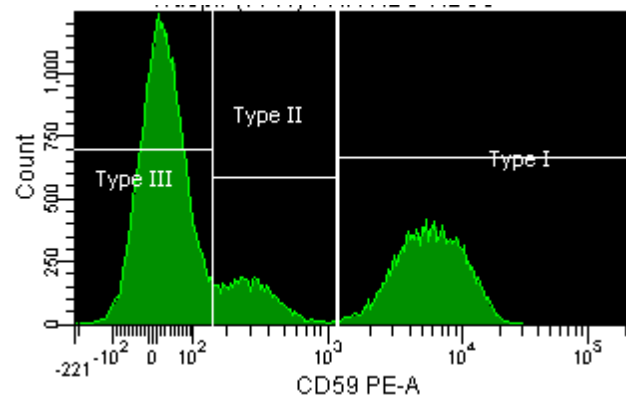
## Normální nález na Ery



## PNH klon typu III na Ery



## PNH klon typu II a III na Ery

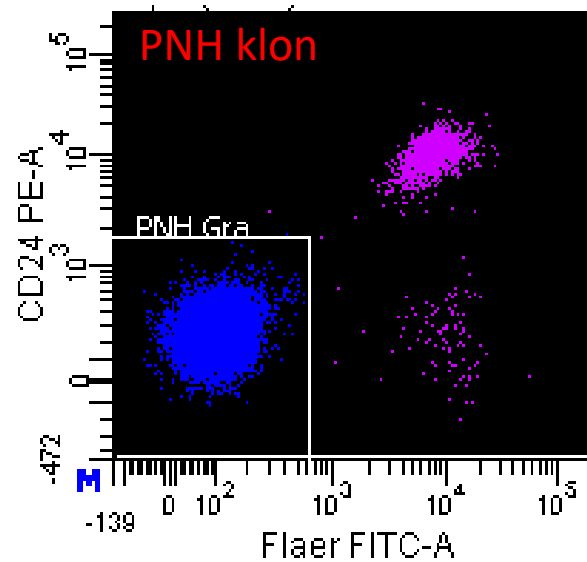
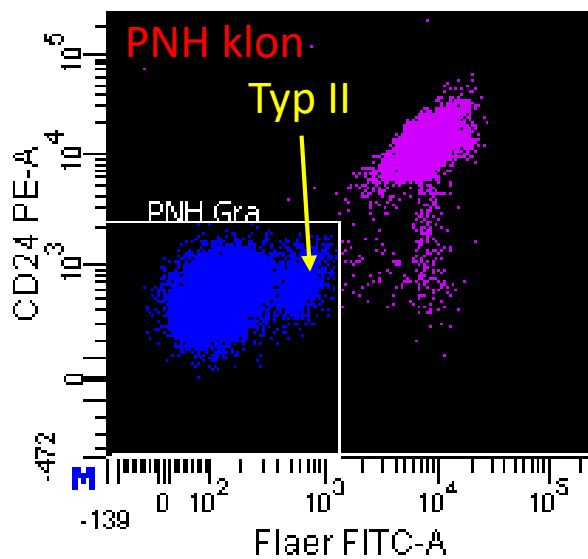
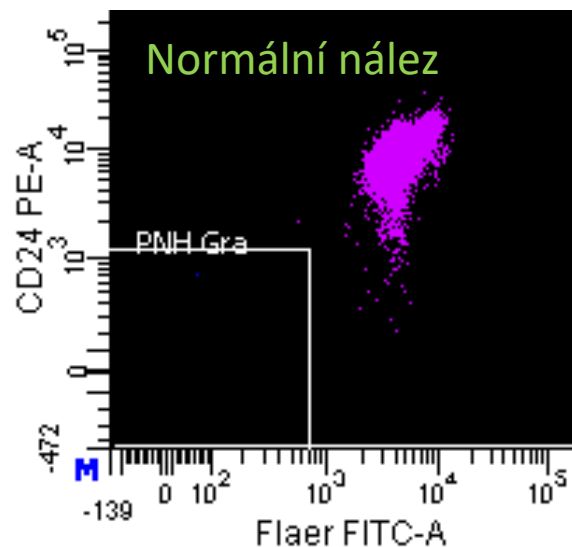


# Vyšetření přítomnosti PNH klonů průtokovou cytometrií - zkumavka Neu

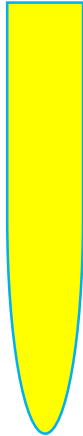


zkumavka **Neu** – Flaer–FITC  
anti-CD24-PE  
anti-CD45-PerCP  
anti-CD15-APC

Citlivost 0,04 – 0,1%



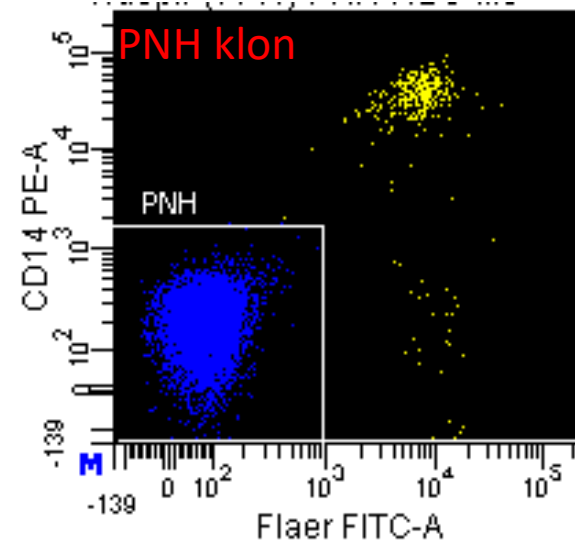
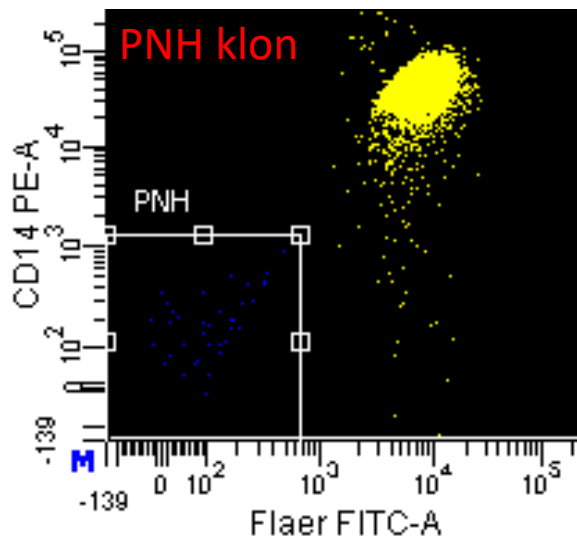
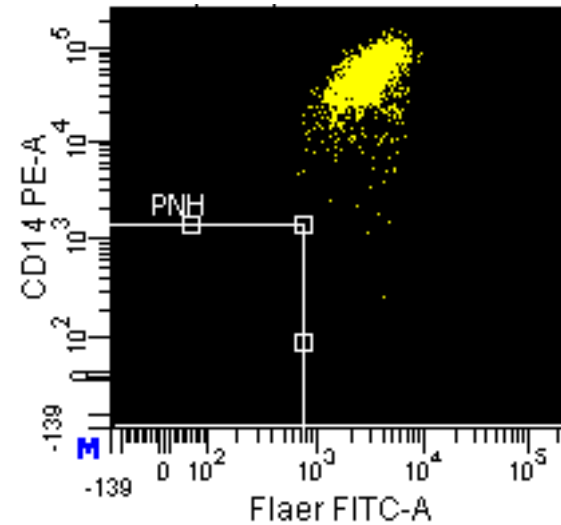
# Vyšetření přítomnosti PNH klonů průtokovou cytometrií zkumavka Mo



zkumavka **Mo** – Flaer–FITC  
anti-CD14-PE  
anti-CD45-PerCP  
anti-CD64-APC

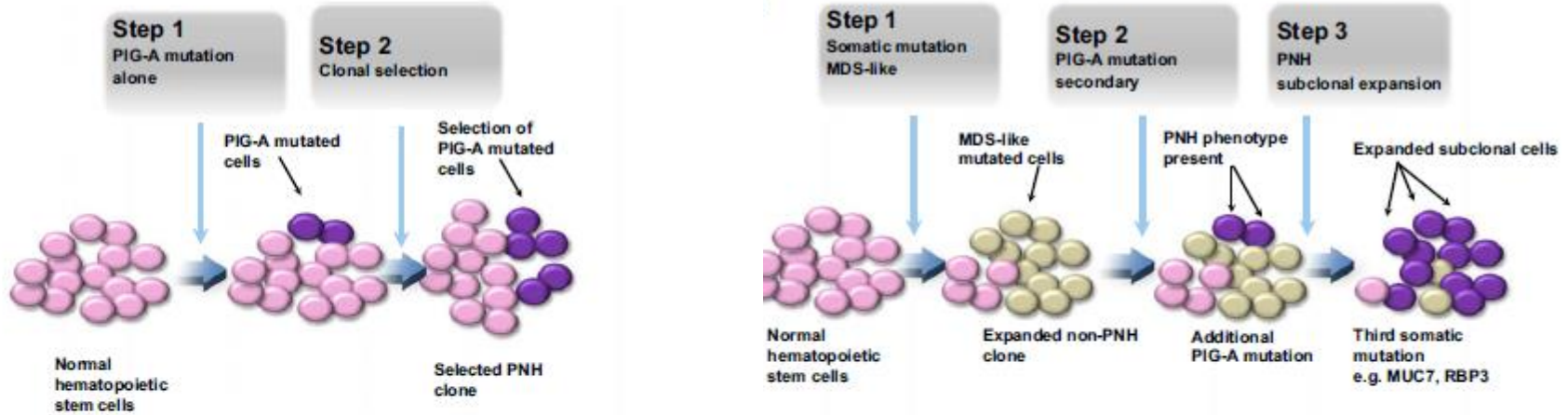
Variabilní citlivost!

Normální nález

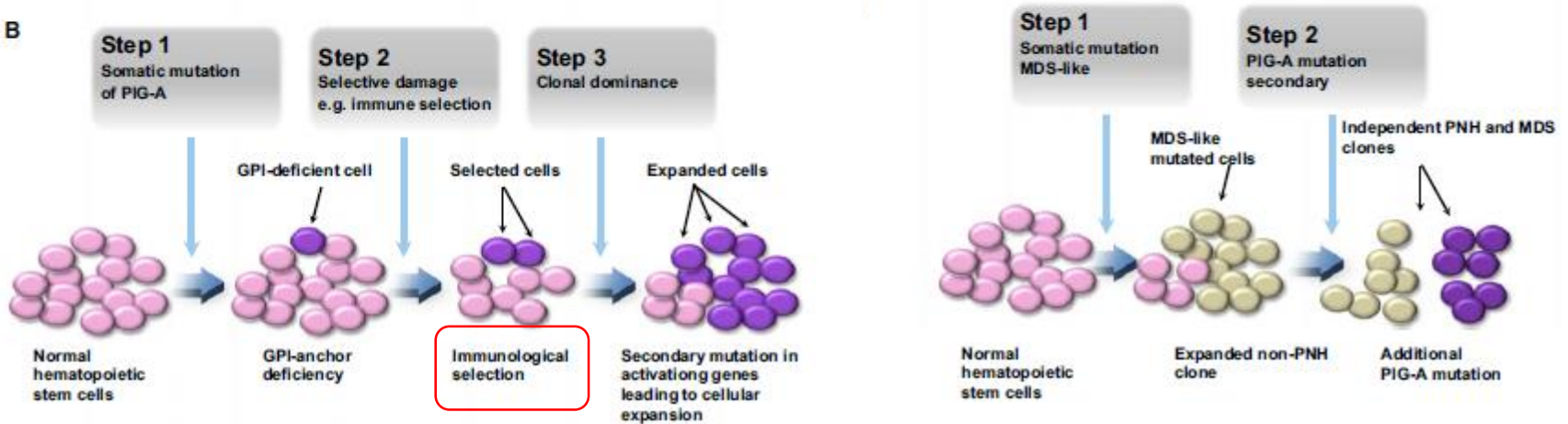


# Klonální evoluce PNH

A



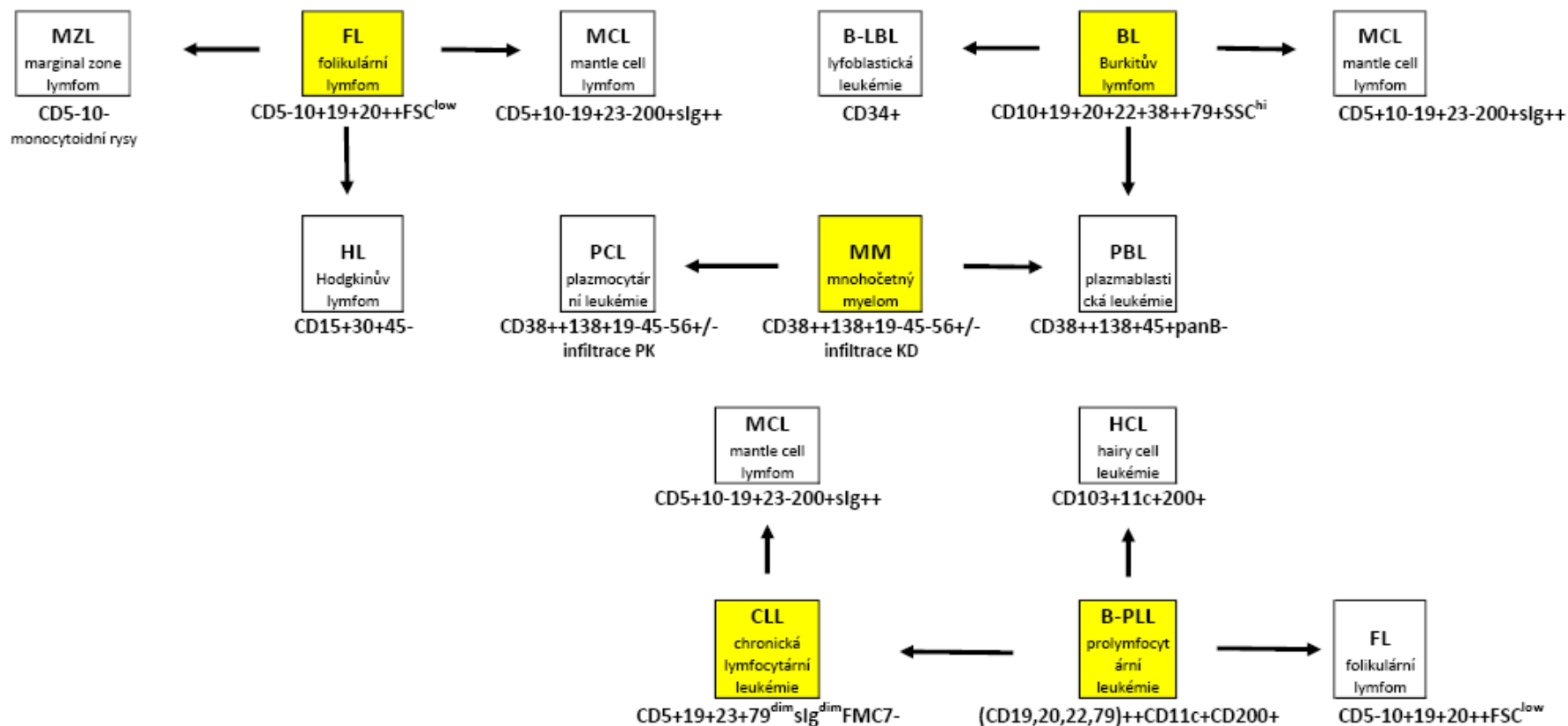
B



J. Schubert and A. Röth, "Update on paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: on the long way to understand the principles of the disease," *Eur J Haematol*, vol. 94, no. 6, pp. 464–473, Jun. 2015.

# Diferenciální diagnostika B lymfoproliferací

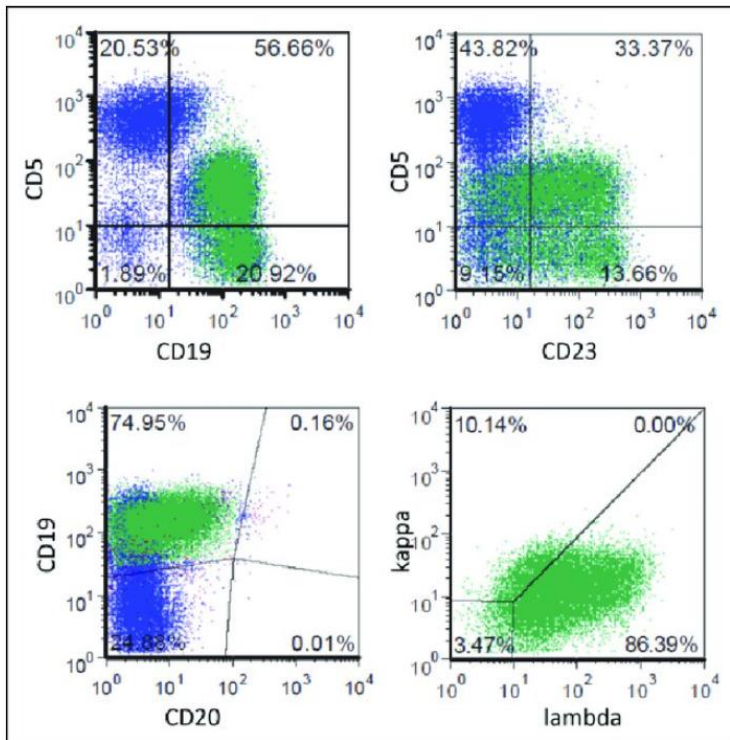
Příbuzné diagnózy – jak je rozlišíme pomocí imunofenotypu





# CLL – chronická lymfocytární leukémie

- Klonální proliferace malých B lymfocytů v PK
- Typický imunofenotyp (CD5<sup>+</sup>19<sup>+</sup>23<sup>+</sup>79b<sup>dim</sup>FMC7<sup>neg</sup>sIg<sup>dim</sup>)
- Infiltrace KD, uzlin



## Figure

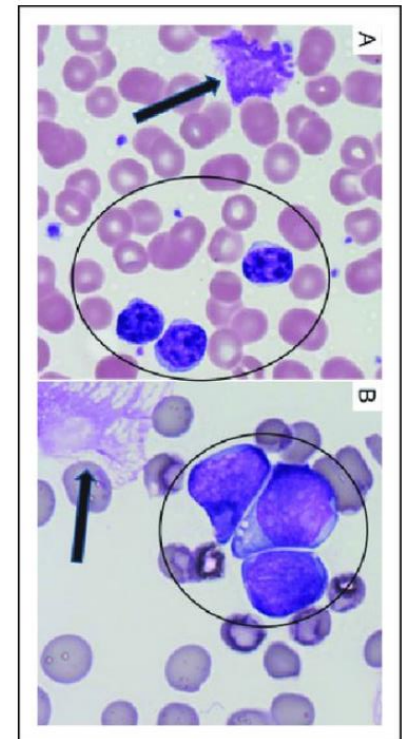
Caption

Figure 2. Flow cytometric phenotype of chronic lymphocytic leukemia (CLL). The neoplastic B cells (green) are positive for CD19, CD5, CD23, CD20 (dim intensity), and show restricted lambda immunoglobulin light chain expression.

Available via license: [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

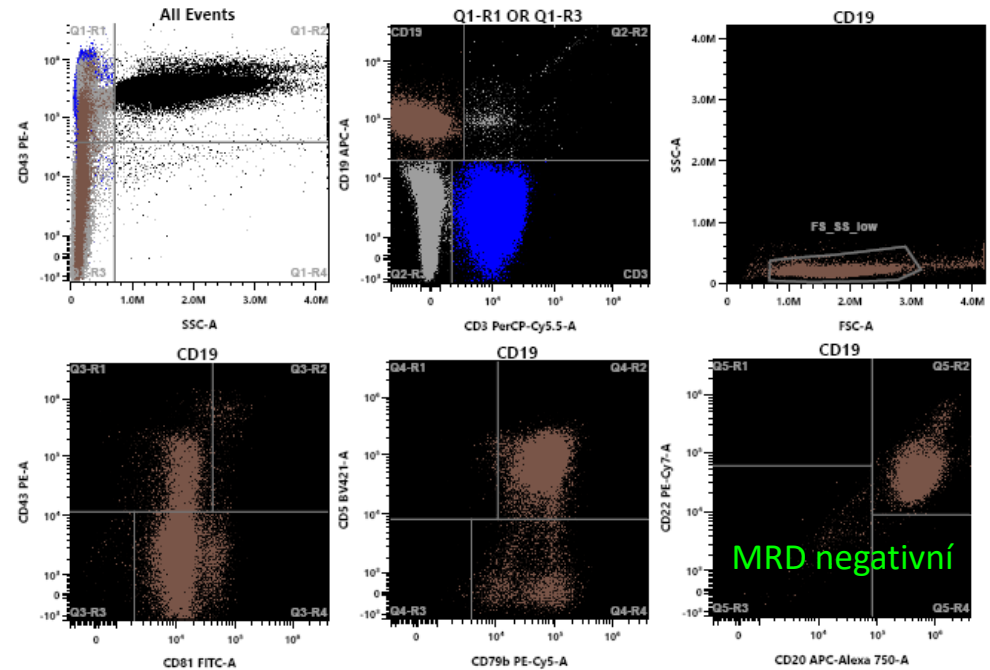
Content may be subject to copyright.

**CLL – zelená populace**

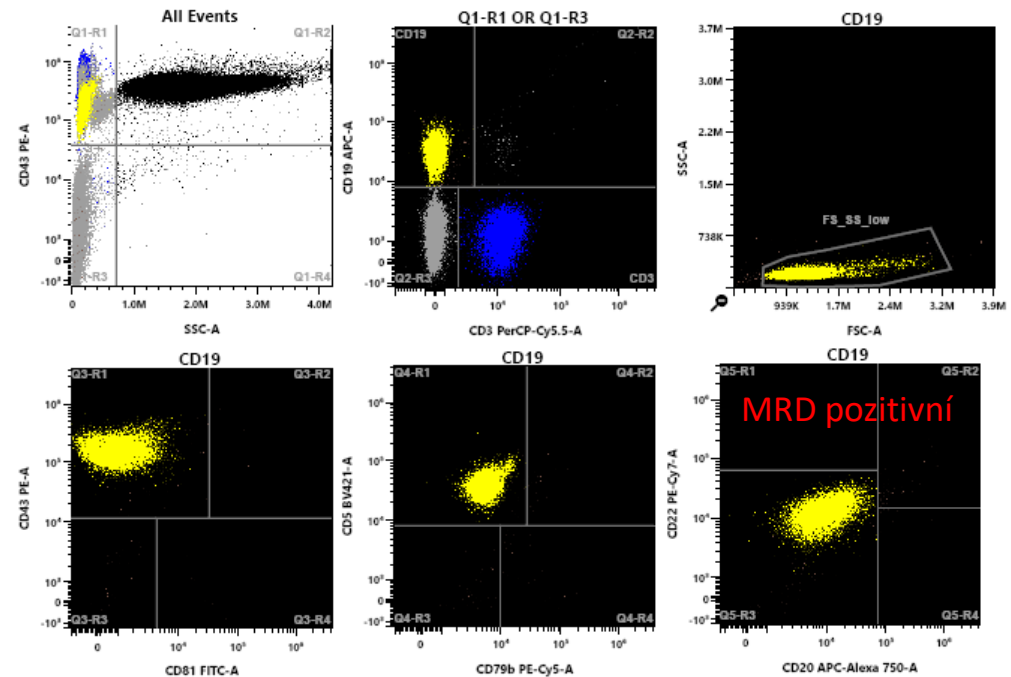


# CLL – MRD

- Rawstronův protokol (9-ti barevná assay) vyšetřována PK, KD
- možnost detekovat CLL buňky bez nutnosti vstupního vyšetření
- Citlivost  $10^{-5}$  až  $10^{-6}$

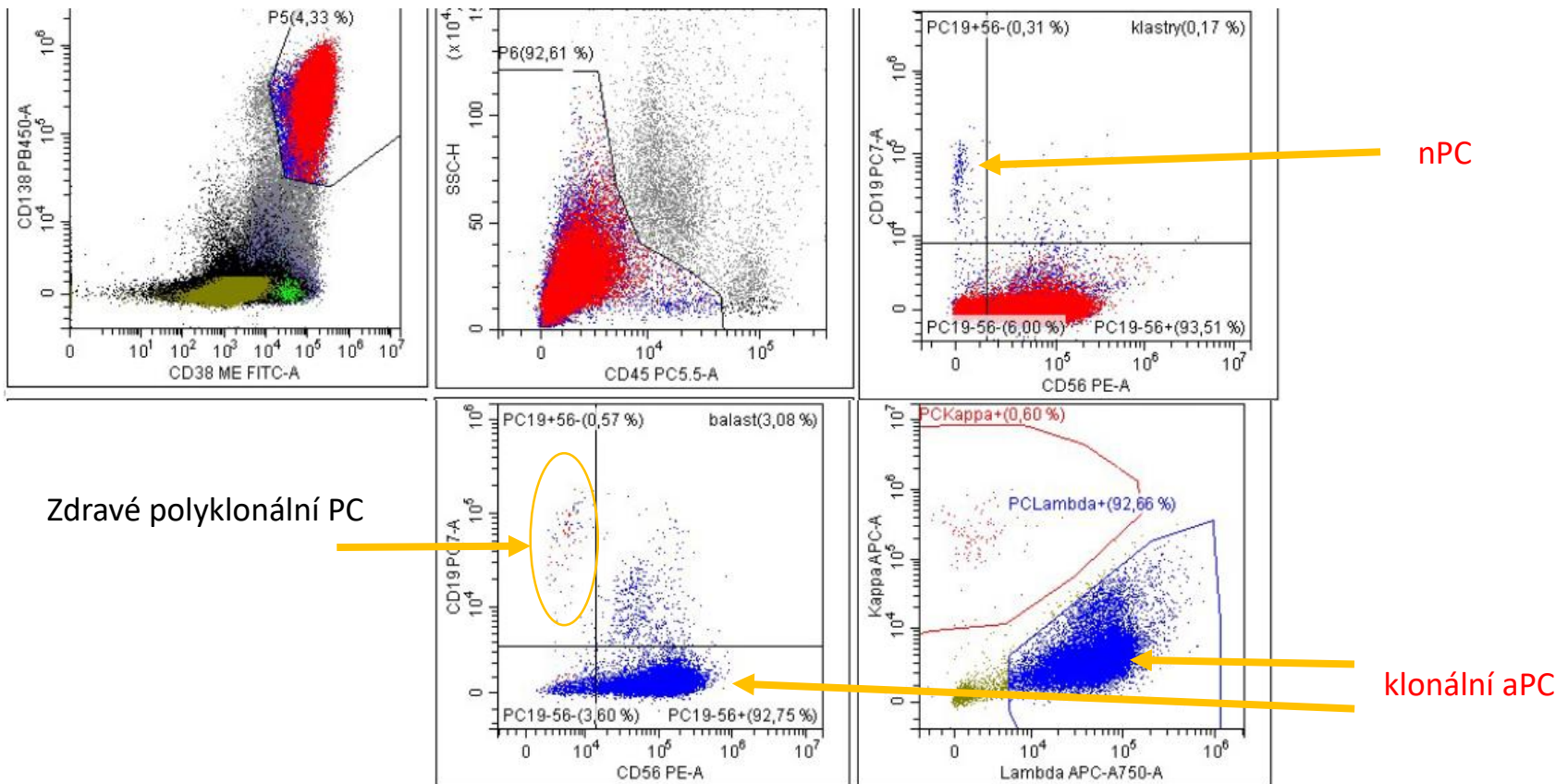


Pozitivní záchyt (žlutá populace)  
 CLL - CD5<sup>+</sup>19<sup>+</sup>20<sup>dim</sup>22<sup>dim</sup>43<sup>+</sup>79b<sup>dim</sup>81<sup>-</sup>



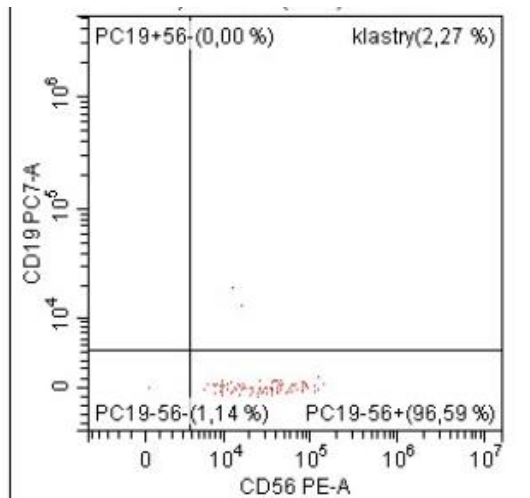
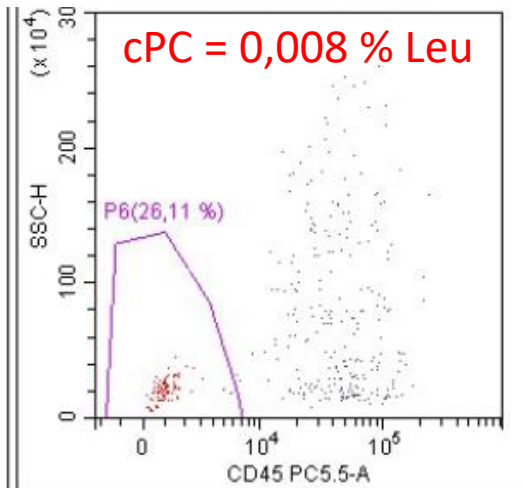
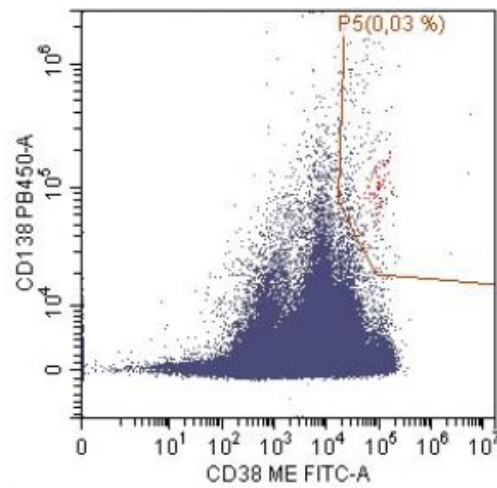
# MM – mnohočetný myelom

- Typický imunofenotyp (CD19-38++45-56+/-138+)
- Infiltrace KD klonálními plazmocytů atypického fenotypu
- EuroFlow panel 2x 8 znaků (vstup i MRD)



# MM – vyšetření PK

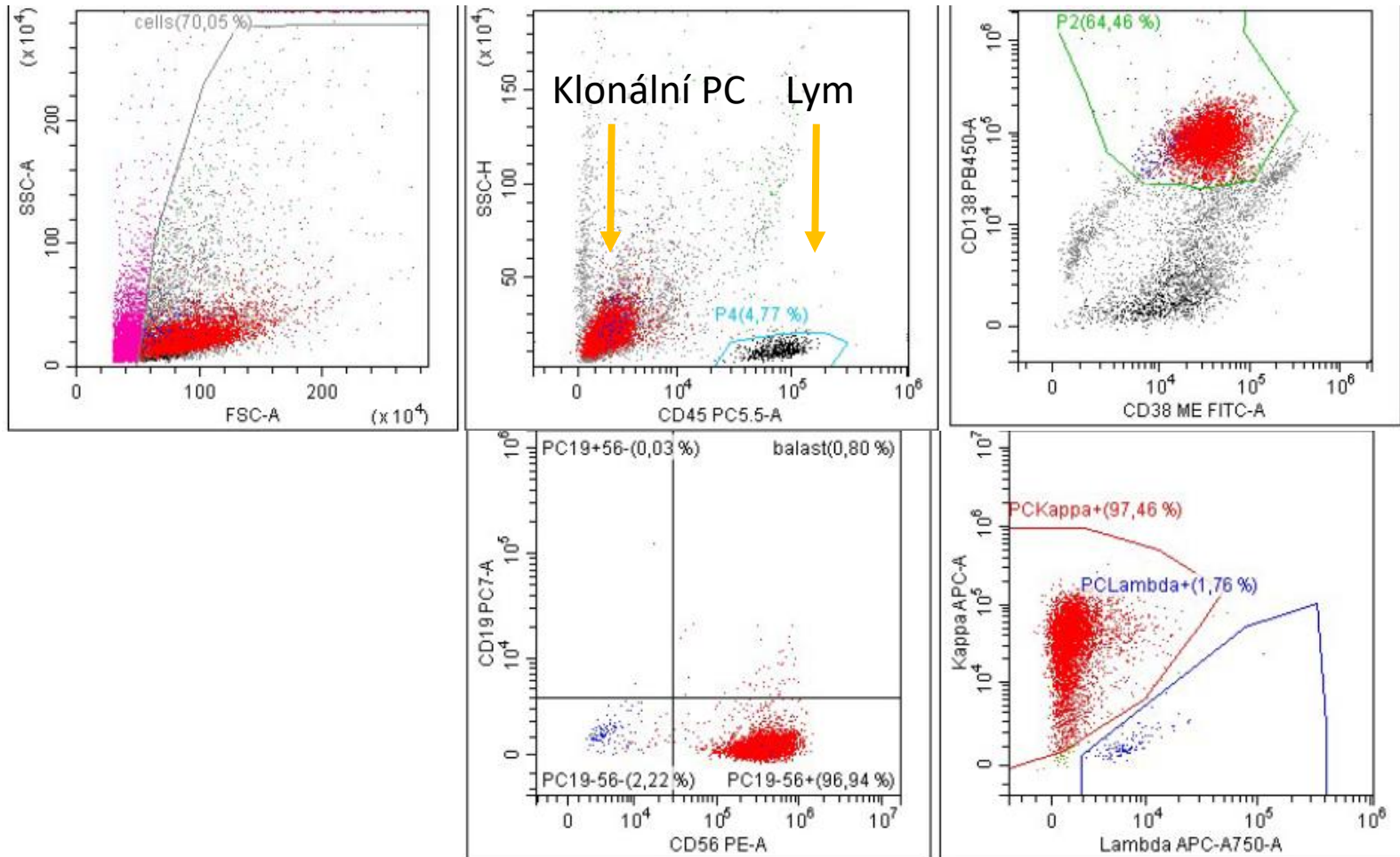
- Zachycení klonální populace cPC při dg. = horší prognóza
- Vyžadována citlivost min.  $10^{-5}$  ideálně  $10^{-6}$
- $>2\%$  cPC = high-risk MM
- Imunofenotyp cPC bývá shodný s aPC v KD



aPC = atypický plazmocyt, cPC = cirkulující nebo klonální PC

# MM – vyšetření tkáně

- Extramedulární a extraoseální MM – klonální PC mimo KD
- Imunofenotyp PC nemusí být shodný s aPC v KD



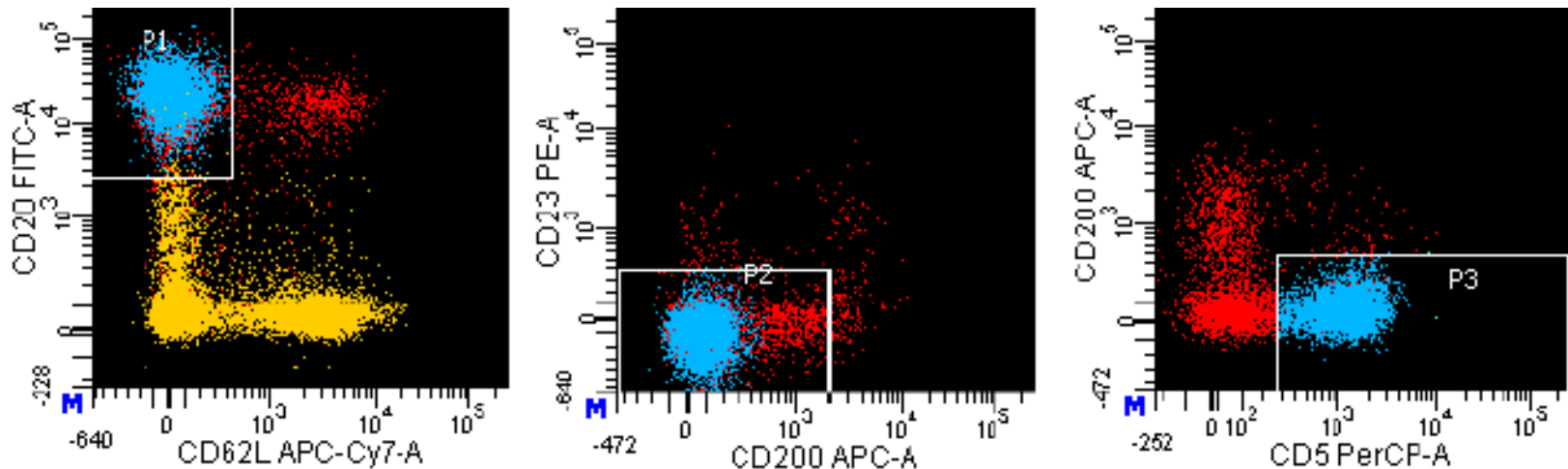
# MCL – mantle-cell lymphom

- Klonální proliferace zralých B lymfocytů v PK
- Typický imunofenotyp (CD5<sup>+</sup>19<sup>+</sup>23<sup>-</sup>sIg<sup>++</sup>)
- Infiltrace KD, uzlin, střeva
- Lze stanovovat MRD také bez znalosti vstupního fenotypu

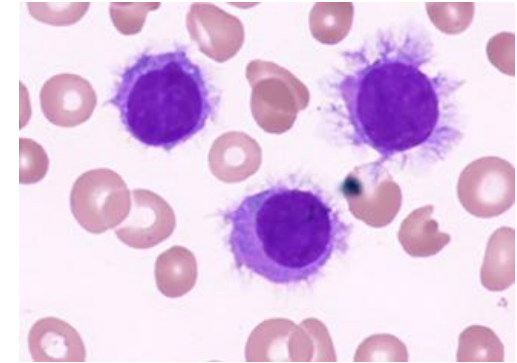
MCL panel pro vstup i MRD

MCL	
FITC	CD20
PE	CD23
PerCP	CD5
PE-Cy7	CD19
APC	CD200
APC-Cy7	CD62L
PB	CD3
PO	CD45

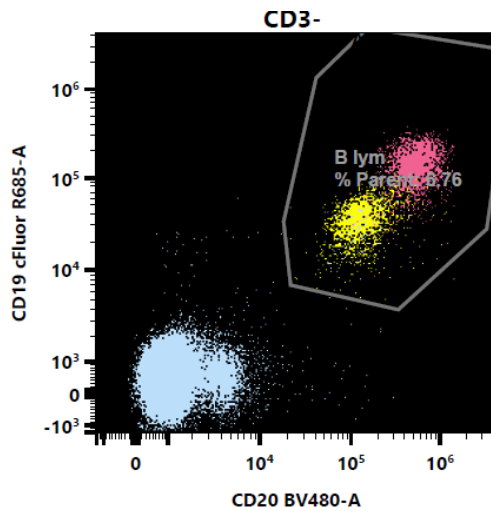
Příklad pozitivního nálezu MCL – modrá populace



# HCL – hairy cell leukemia



- Tvoří 2 % leukémií
- Mutace V600E *BRAF*
- 3 typy dle FCM: klasická, variantní a CD5+
- HCL panel: CD3, 10, 11c, 19, 20, 25, 45, 48, 103, 123, 200, 305



Gate	Count	% B lym
CD10	2,152	51.89
CD11c	2,196	52.95
CD25	2,183	52.64
CD48++	2,393	57.70
CD103	2,263	54.57
CD123	2,284	55.08
CD200++	2,127	51.29
CD305++	2,097	50.57
HCL leu	2,102	50.69

Růžová = HCL  
Žlutá = zdravé B lym

