

ΒΑΣΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Γ' ΜΕΡΟΣ

«Η ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΗΝ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ»

Γιάννενα, 13-15 Σεπτεμβρίου 2013

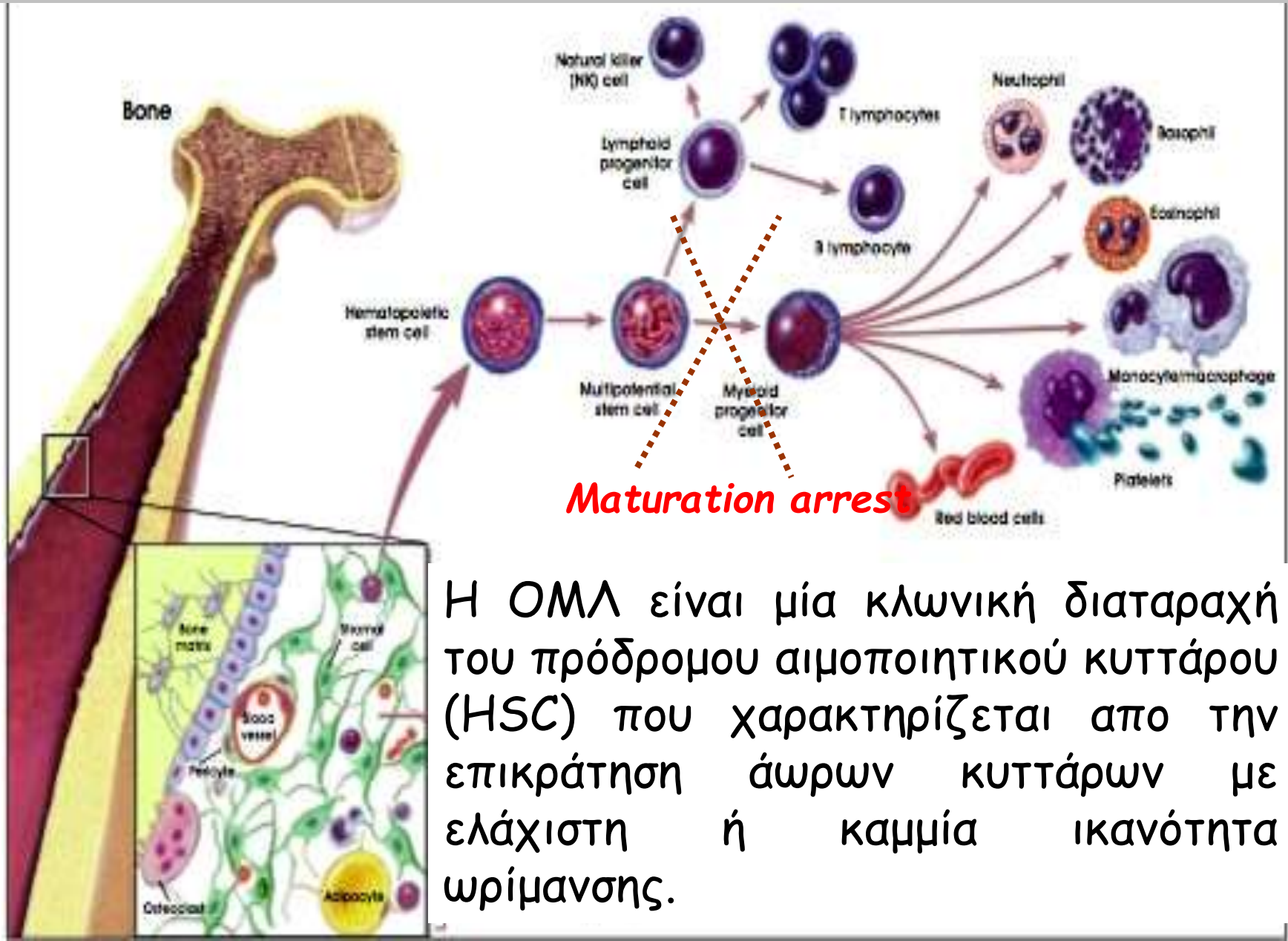
ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

**ΟΞΕΙΕΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ
ΑΔΙΕΥΚΡΙΝΙΣΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ**

ΔΗΜΗΤΡΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΛΙΛΑ

Επιμ Α' Τμήμα Ανοσολογίας- Ιστοσυμβατότητας Γ.Ν.Α «Λαϊκό»

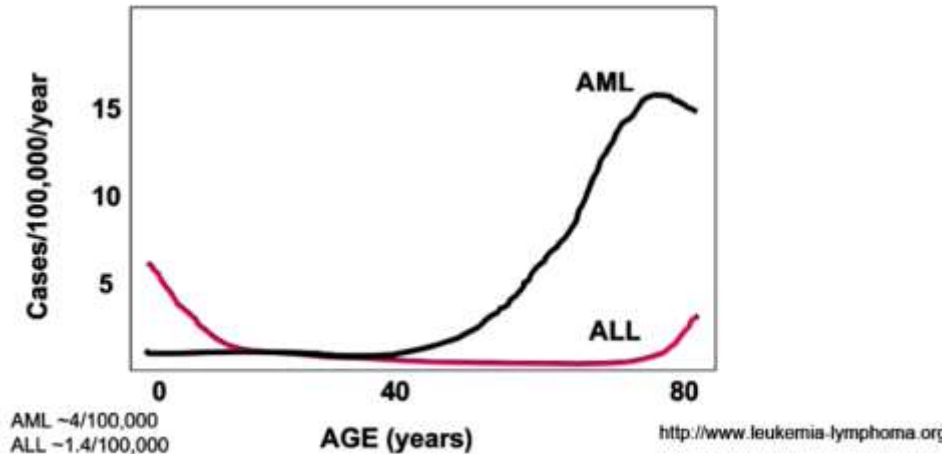
ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ



Η ΟΜΛ είναι μία κλωνική διαταραχή του πρόδρομου αιμοποιητικού κυττάρου (HSC) που χαρακτηρίζεται από την επικράτηση άωρων κυττάρων με ελάχιστη ή καμμία ικανότητα ωρίμανσης.

ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

- Πιο συχνή στους ενήλικες
- Στους **ενήλικες 70-80%** των περιπτώσεων οξείας λευχαιμίας είναι **ΟΜΛ**.
- Η επίπτωση της αυξάνει με την ηλικία.
- Στα **παιδιά ~15%** των περιπτώσεων οξείας λευχαιμίας είναι **ΟΜΛ**.
- Πιο συχνή...
 - Το πρώτο έτος της ζωής
 - Σε ομάδες υψηλού κινδύνου (σύνδρομο Down)



Two-hit model of AML pathogenesis

Class I Mutations

Confer proliferative and/or survival advantage, but do not affect differentiation

FLT3-ITD
FLT3-TKD
KIT
JAK2V617F
NRAS

Class II Mutations

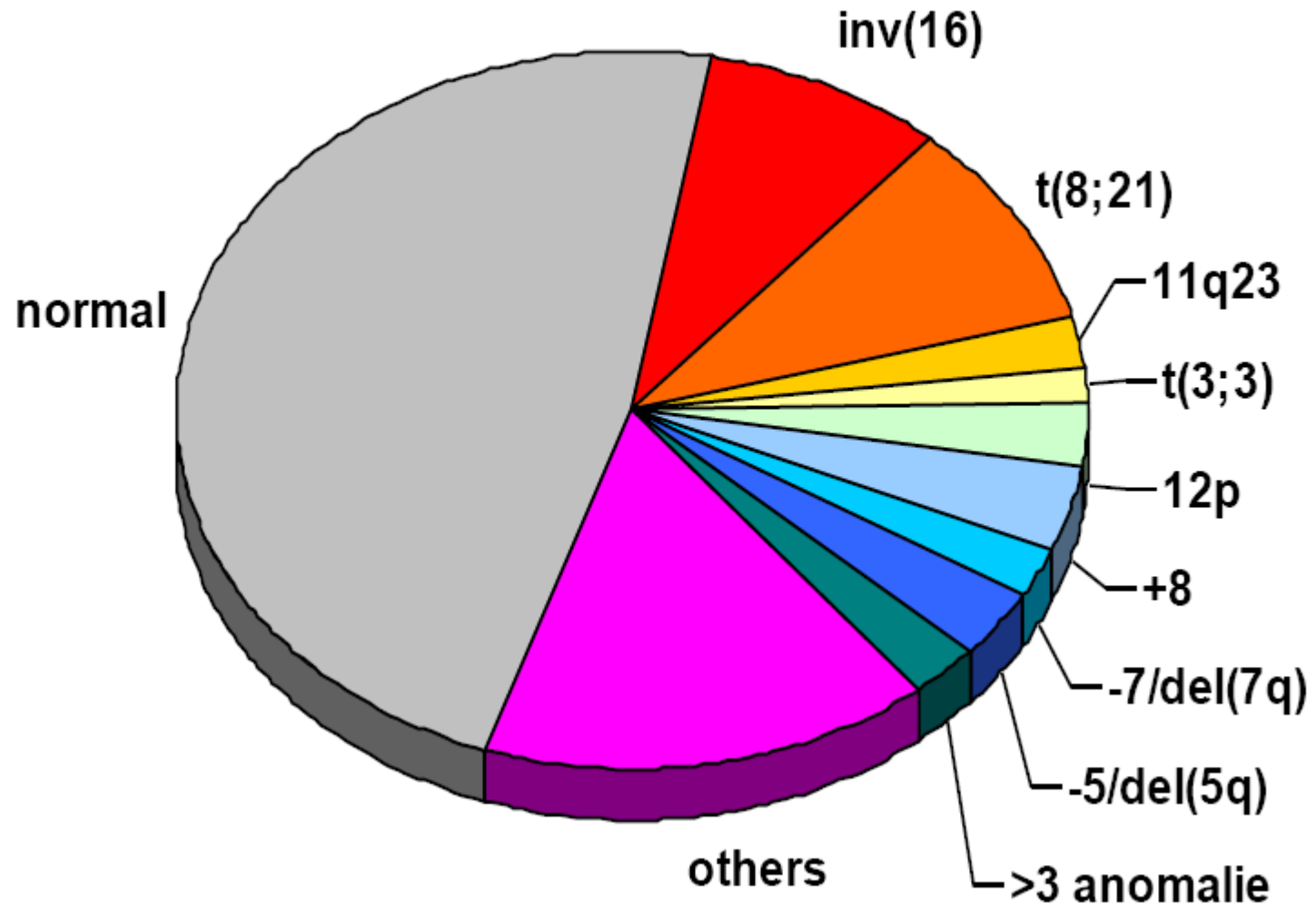
Serve primarily to impair hematopoietic differentiation and subsequent apoptosis

PML-RARA
RUNX1-RUNX1T1
CBFB-MYH11
CEBPA
RUNX1

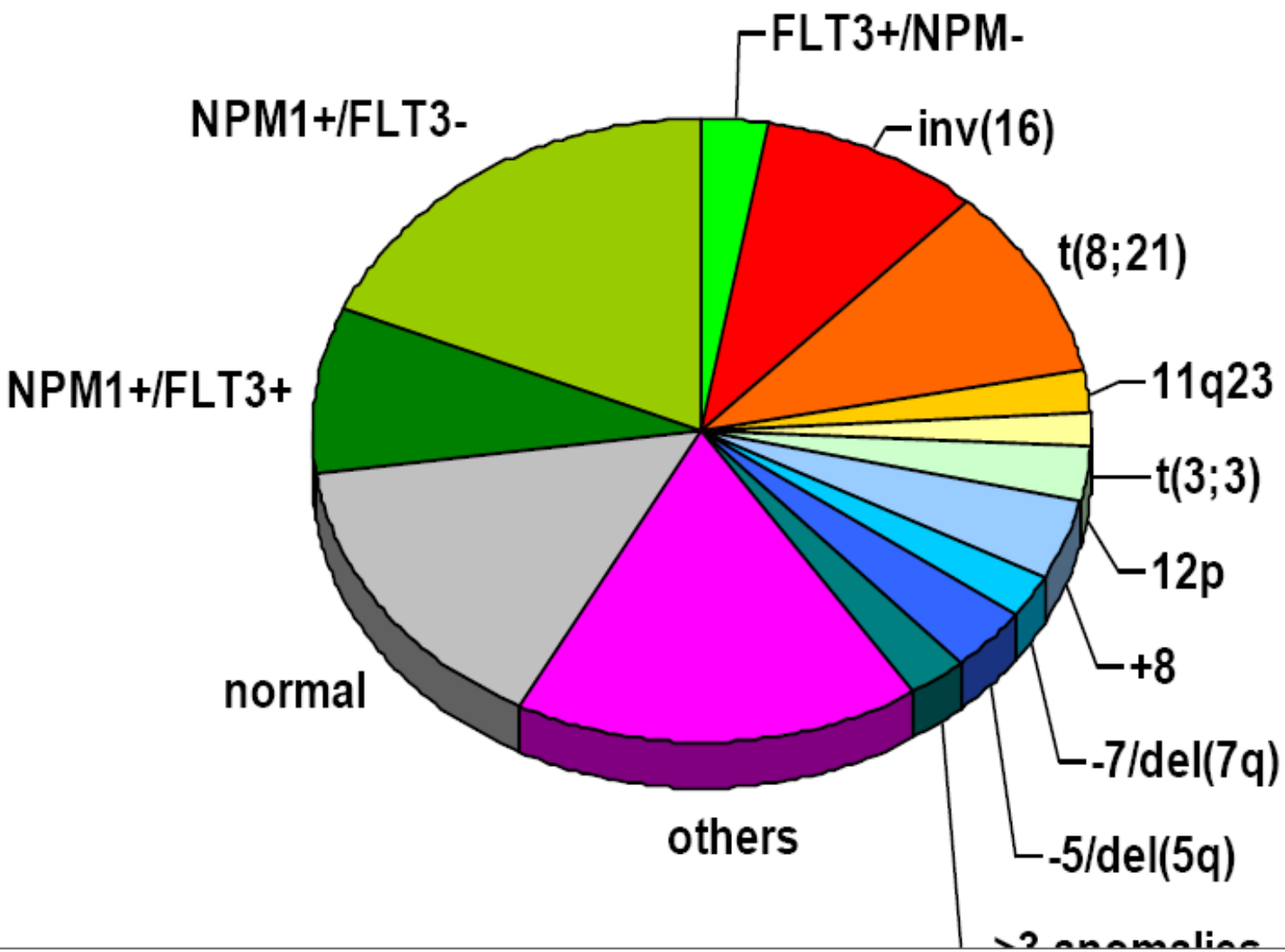


AML

ΚΑΡΥΟΤΥΠΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΣΤΗΝ ΟΜΛ



Ακόμα και ο φυσιολογικός καρυότυπος παρουσιάζει μοριακή ετερογένεια

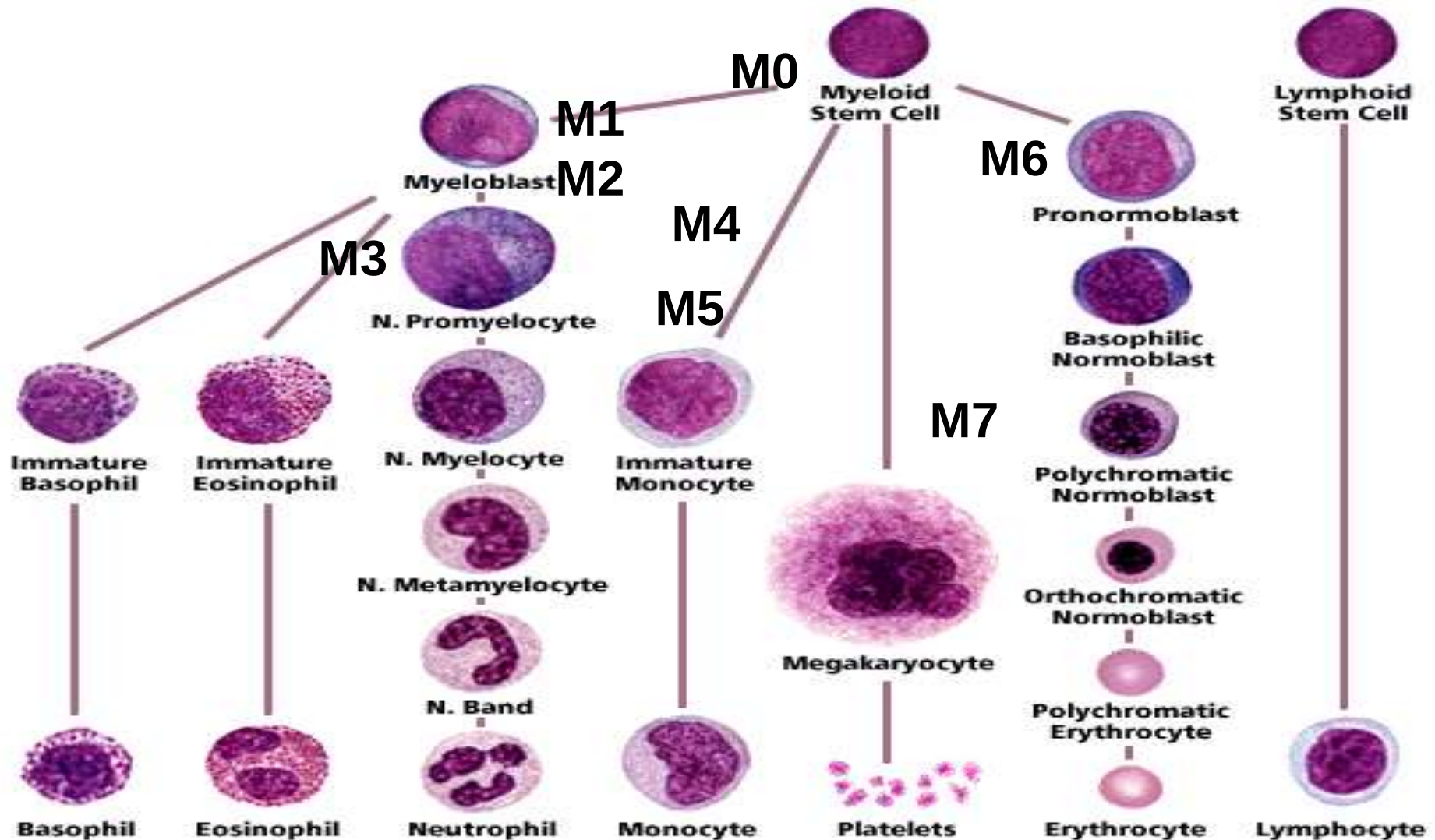


FAB classification of AML (1976)

M0—Minimally differentiated	>30% blasts, <3% blasts MPO+, SBB+
M1—Without maturation	>30% blasts, >3% blasts MPO+, SBB+ <10% maturing myeloids (promyelocyte and beyond)
M2—With maturation	>30% blasts >10% maturing myeloids (promyelocyte and beyond)
M3—Promyelocytic	>30% blast equivalents (neoplastic promyelocytes and myeloblasts)
M4—Myelomonocytic	>30% blast equivalents (myeloblasts, monoblasts and promonocytes) >20% monocytic elements (NSE+) >20% myeloid elements (MPO+, SBB+)
M5 M5a—Monoblastic(>80% monoblasts) M5b—Monocytic (<80% monoblasts)	>30% blast equivalents (myeloblasts, monoblasts and promonocytes) >80% NSE+ monocytic elements <20% MPO+, SBB+ myeloid elements
M6—Erythroid M6a—Erythroleukemia M6b—Pure erythroid leukemia	>50% erythroid elements >30% of nonerythroid elements are myeloid blasts >80% immature erythroid elements
M7—Megakaryocytic	>30% blasts of megakaryocytic lineage

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ FAB

ΒΑΣΙΖΕΤΑΙ ΚΥΡΙΩΣ ΣΤΗΝ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΕΙΑ



2008 WHO classification of AML

- **AML with recurrent cytogenetic abnormalities**

– AML with t(8;21)(q22;q22), (<i>AML1/ETO</i>)	5%
– AML with inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13;q22), (<i>CBFbeta/MYH11</i>)	5-8%
– AML with t(15;17)(q22;q12), (<i>PML/RARalpha</i>) and variants	5-8%
– AML with t(9;11)(p22q23) (<i>MLL</i>)	2% adults
– AML with t(6;9)(p23q34) (<i>DEK-NUP214</i>)	1-2%
– AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2) (<i>RPN1-EVI1</i>)	1-2%
– AML with t(1;22)(p13q13) (<i>RBC15-MKL1</i>)	<1%
– Provisional: AML with gene mutations (<i>NPM1</i> , <i>CEBPA</i>)	

- **AML with myelodysplasia related changes** 24-35%

- **Therapy related myeloid neoplasms** 10-20%

- **AML not otherwise specified**

25-30%

– AML minimally differentiated	<5%
– AML without maturation	5-10%
– AML with maturation	10%
– Acute myelomonocytic leukemia	5-10%
– Acute monoblastic and monocytic leukemia	<5%, <5%
– Acute erythroid leukemia	<5%, rare
– Acute megakaryoblastic leukemia	<5%, [+21, t(1;22)]
– Acute basophilic leukemia	<1%
– Acute panmyelosis with myelofibrosis	rare

- **Myeloid sarcoma**

- **Myeloid proliferations related to Down syndrome**

- **Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms**

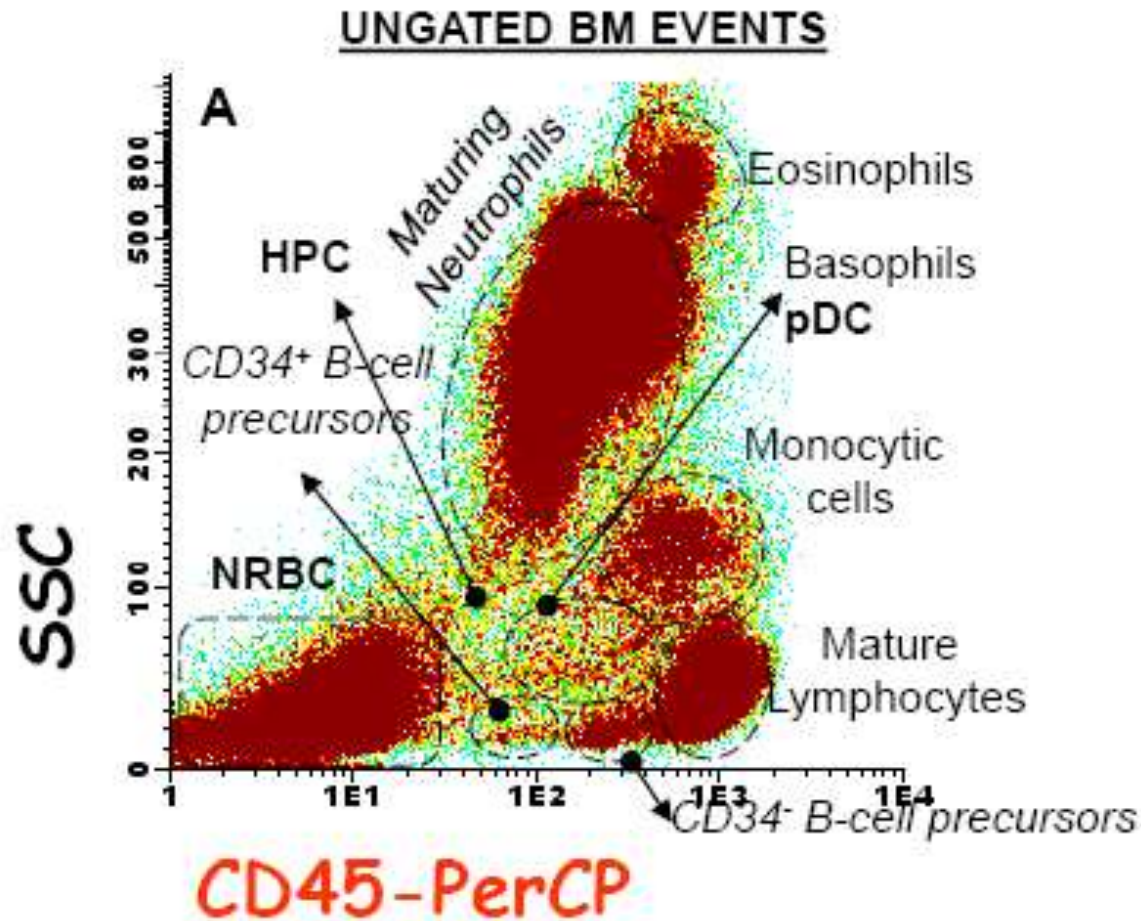
- **Acute leukemias of ambiguous lineage AUL/ MPAL**

Test / procedures in the initial work-up of a patient with AML

(Dohner et al, Blood 2009)

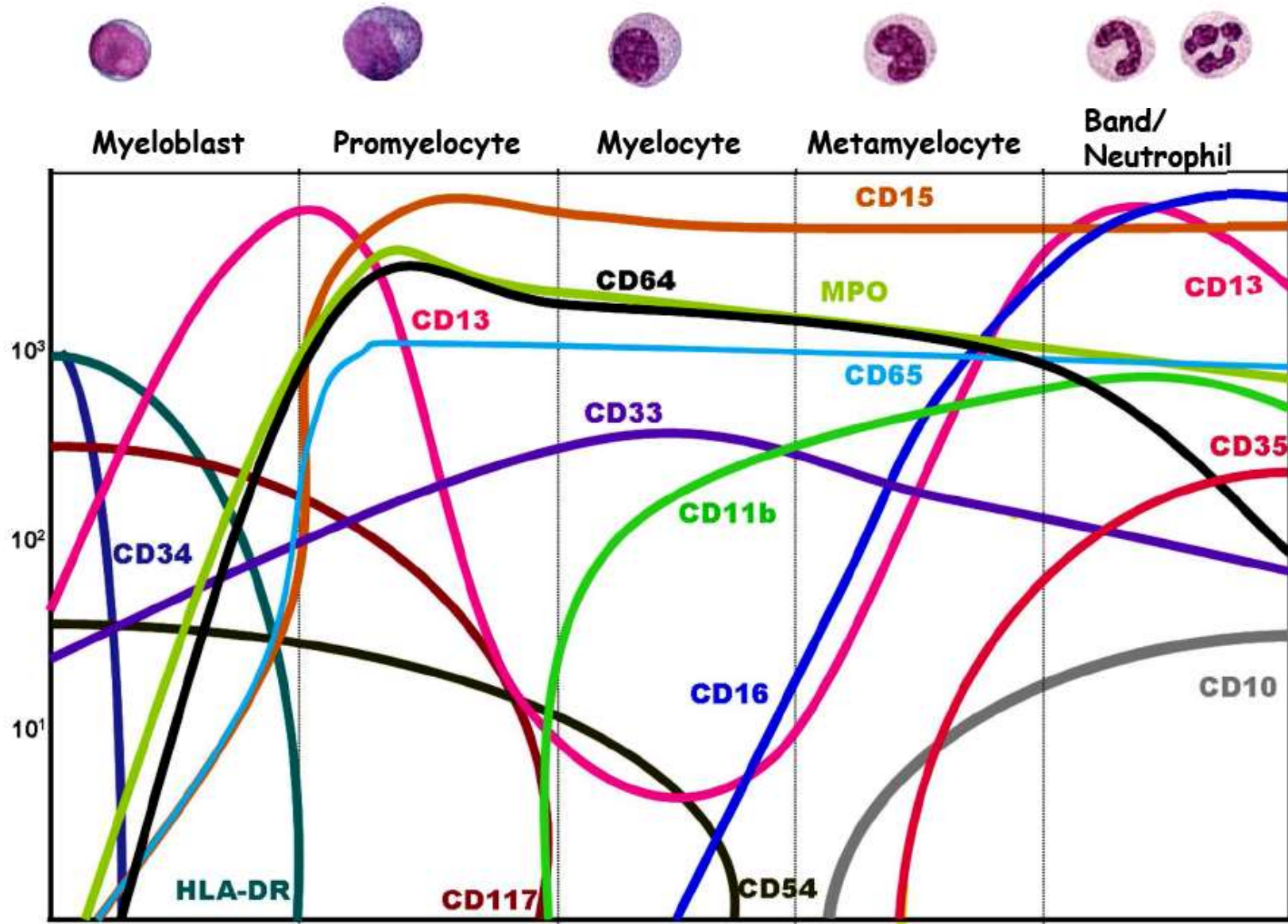
Test / Procedure	General Practice	Clinical Trial
<i>Tests to establish the diagnosis</i>		
Complete blood counts and differential count	Yes	Yes
Bone marrow aspirate	Yes	Yes
Bone marrow trephine biopsy	Optional	Optional
Immunophenotyping	Yes	Yes
Cytogenetics	Yes	Yes
<i>RUNX1-RUNX1T1, CBFB-MYH11, PML-RARA,</i> or other gene fusion screening	Optional	Optional
<i>Additional tests / procedures at diagnosis</i>		
Demographics and medical history ^c	Yes	Yes
Performance status (ECOG/WHO score)	Yes	Yes
Analysis of comorbidities	Yes	Yes
Biochemistry, coagulation tests, urine analysis ^d	Yes	Yes
Serum pregnancy test ^e	Yes	Yes
Information on oocyte and sperm cryopreservation	Optional	Optional
Eligibility assessment for allogeneic HSCT	Yes	Yes
Hepatitis A, B, C; HIV-1 testing	Yes	Yes
Chest X-ray, 12-lead ECG; echocardiography (on indication)	Yes	Yes
Lumbar puncture ⁿ	No	No
Biobanking ^j	Optional	Yes
<i>Prognostic / predictive marker assessment</i>		
<i>NPM1, CEBPA, FLT3</i> gene mutation	Optional	Yes
<i>WT1, RUNX1, MLL, KIT, RAS, TP53, TET2, IDH1</i> gene mutation	No	Investigational
<i>ERG, MN1, EVI1, BAALC</i> gene expression	No	Investigational
Detection of minimal residual disease	No	Investigational

Τα κύτταρα του φυσιολογικού μυελού

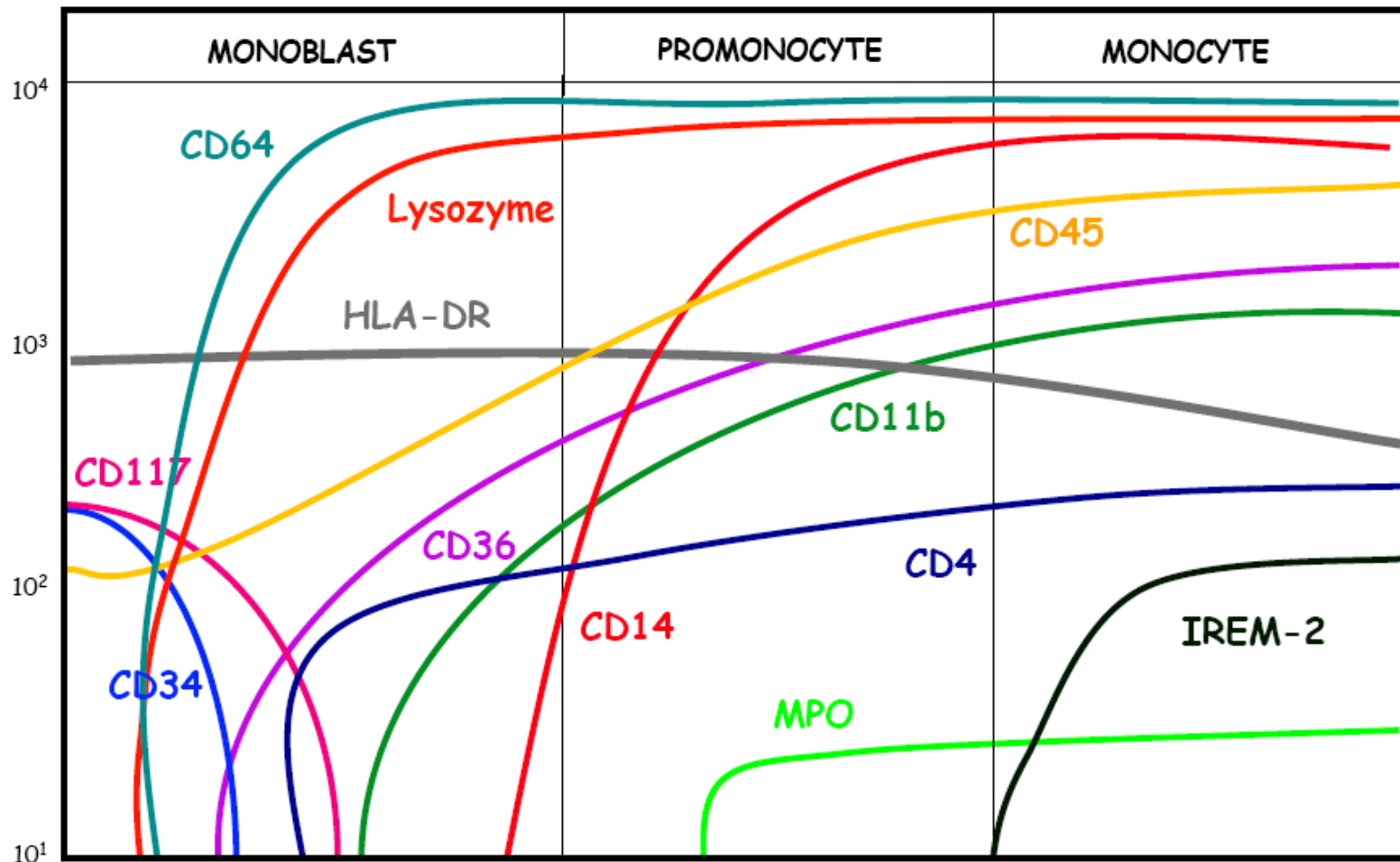


Οι διάφοροι πληθυσμοί των άωρων και ώριμων κυττάρων του φυσιολογικού μυελού καταλαμβάνουν χαρακτηριστική θέση στο στικτόγραμμα CD45/SSC.

Δείκτες κατά την φυσιολογική διαφοροποίηση της μυελικής σειράς



Δείκτες κατά την φυσιολογική διαφοροποίηση της μονοκυτταρικής σειράς



Μονοβλάστες : CD64+ CD36+ CD11b+ CD4+ **CD14 - IREM2 - MPO -**

Προμονοκύτταρα : CD64++ CD36+ CD11b+ CD4+ **CD14 + IREM2 - MPO dim**

Μονοκύτταρα : CD64++ CD36+ CD11b+ CD4+ **CD14 + IREM2 + MPO dim**

Four- and Five-Color Flow Cytometry Analysis of Leukocyte Differentiation Pathways in Normal Bone Marrow: A Reference Document Based on a Systematic Approach by the GTLLF and GEIL

Christine Arnoulet,¹ Marie C. Béné,² Françoise Durrieu,³ Jean Feuillard,⁴
Chantal Fossat,⁵ Bernard Husson,⁶ Hélène Jouault,⁷
Marc Maynadié,⁸ and Francis Lacombe^{9*}

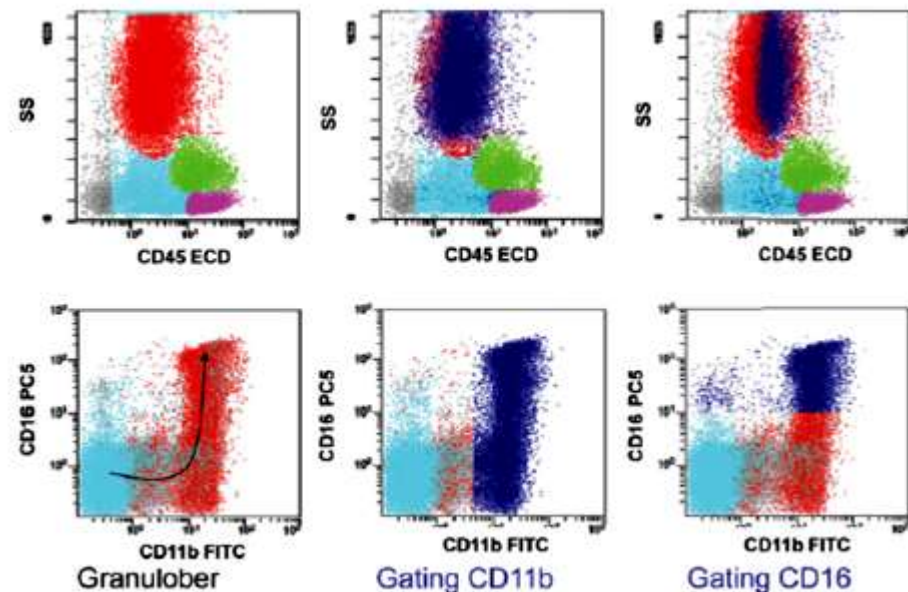
Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 78B:3–10 (2010)

ΑΤΛΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ

Table 1
Antibody Combinations Used for the Analysis of Normal Human Bone Marrow

Combination number	Color 1 ^a	Color 2 ^a	Color 3 ^a	CD45
1	CD11b	CD14	CD16	CD45
2	CD11b	CD117	CD34	CD45
3	CD36	CD13	CD33	CD45
4	CD34	CD13	CD33	CD45
5	CD38	DR	CD34	CD45
6	CD38	CD10	CD19	CD45
7	DR	CD117	CD34	CD45
8	CD34	CD56	CD19	CD45
9	CD64	CD24	CD10	CD45
10	CD7	CD117	CD34	CD45
11	CD22	CD10	CD20	CD45
12	CD4	CD2	CD56	CD45

^aThe colors indicated are not necessarily related to fluorochrome excitation wavelengths, as shown in Table 2.



Άτλας με τα μονοπάτια διαφοροποίησης των κυττάρων του φυσιολογικού μυελού

Πολυχρωματική Κυτταρομετρία στην διάγνωση της ΟΜΛ

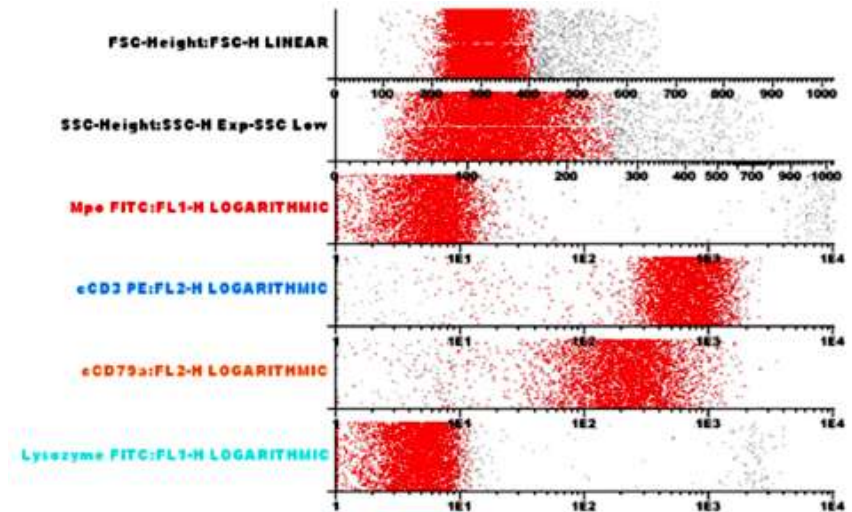
Σε αρκετά κέντρα του εξωτερικού εφαρμόζεται στην ρουτίνα η μελέτη με συνδυασμούς 6, 8 ή και περισσότερων χρωμάτων και χρησιμοποιούνται αυτοματοποιημένα προγράμματα ανάλυσης των δεδομένων (πχ INFINICYT) για την γρήγορη επεξεργασία των πολυάριθμων πληροφοριών που προκύπτουν από την πολυπαραμετρική ανάλυση

4 June 2009

EuroFlow

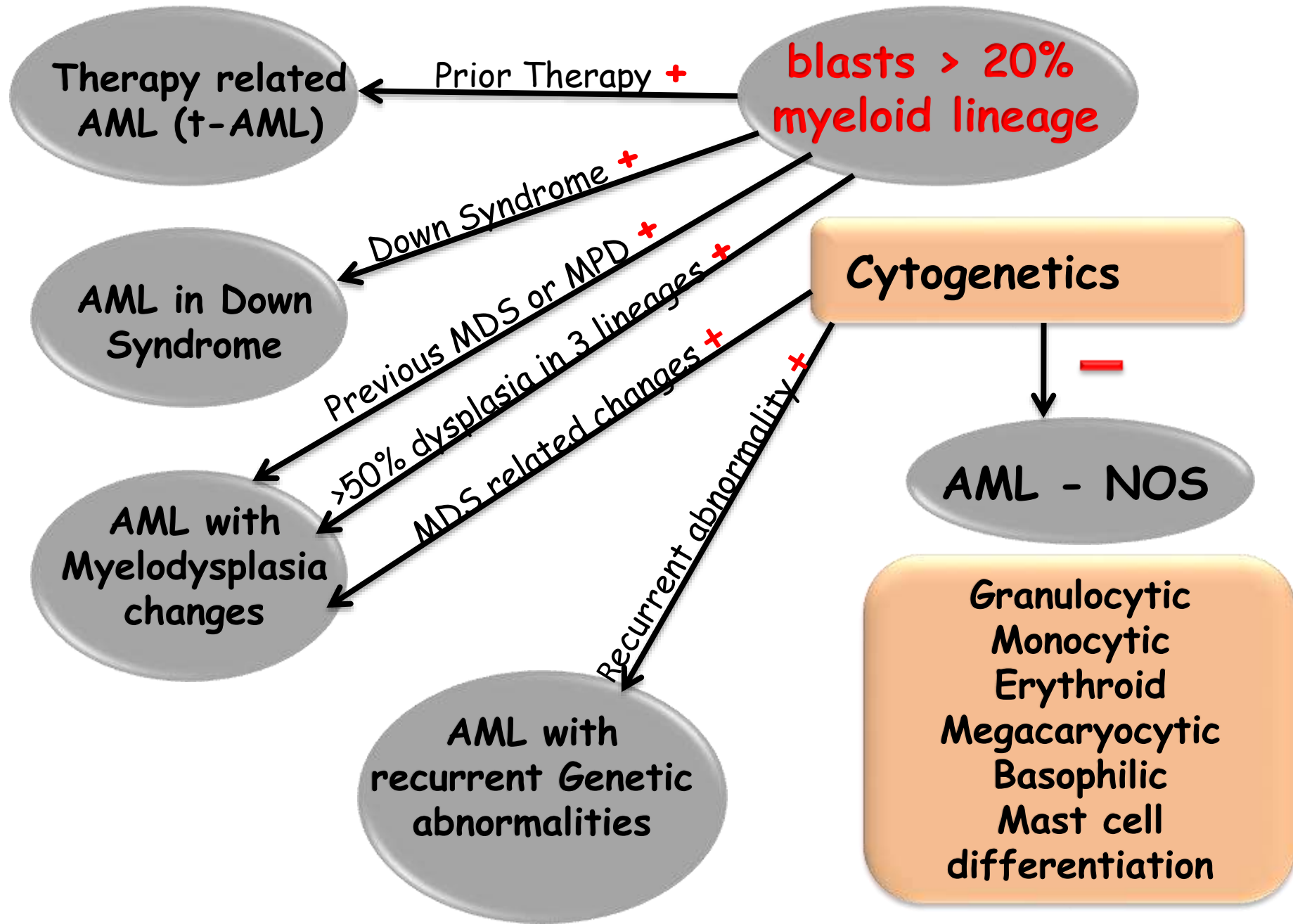
TABLE 7. Multi-tube EuroFlow classification combinations for AML/MDS. *

Tube	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerC-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	CD36	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



Για την σωστή διάγνωση και ταξινόμηση μιας ΟΛ δεν είναι απαραίτητη η χρησιμοποίηση πολλών χρωμάτων και πολύπλοκων προγραμμάτων ανάλυσης αλλά **είναι απαραίτητη** η γνώση των ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών των σταδίων διαφοροποίησης και ωρίμανσης των κυττάρων, η επιλογή του κατάλληλου panel δεικτών, η σωστή ρύθμιση του κυτταρομετρητή, η εφαρμογή κάποιων κοινά αποδεκτών κριτηρίων (WHO, 2008) και κυρίως η εμπειρία.

Αλγόριθμος για την διάγνωση και ταξινόμηση της ΟΜΛ



Η ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΟΜΛ

- Η πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής με την χρησιμοποίηση 3-4 τουλάχιστον φθοριοχρωμάτων είναι **μέθοδος εκλογής**

- ✓ για τον χαρακτηρισμό της σειράς (ΟΜΛ - ΟΛΛ)

- ✓ την λεπτομερέστερη ταξινόμηση σε υποκατηγορίες

ΟΜΛ (M0, M1, M2, M3, M4/M5, M6, M7)

- ✓ την διάγνωση λευχαιμιών που τα παθολογικά κύτταρα δεν έχουν σαφή μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως είναι

- η αδιαφοροποίητη λευχαιμία, (AUL)

- οι λευχαιμίες με μικτό φαινότυπο (MPAL-Mixed Phenotype Acute Leukemia)

- η μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία

- το νεόπλασμα απο πλάσματοκυτταροειδή δένδριτικά κύτταρα (BDCN)

Η ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΟΜΛ

Τα τελευταία χρόνια από διάφορες ομάδες γίνονται προσπάθειες καθορισμού συγκεκριμένων κατευθυντήριων συστάσεων που αφορούν τους συνδυασμούς και τον αριθμό των ΜοAbs που πρέπει να χρησιμοποιούνται για την διάγνωση της ΟΜΛ με σκοπό την προτυποποίηση της μεθόδου.

Multiparameter immunophenotypic procedures: standardization efforts

- **CLSI** (Clinical Laboratory Standards Institute):
 - Stetler-Stevenson et al.: Clinical flow cytometric analysis of neoplastic hematolymphoid cells: Approved guideline. CLSI document H43-A2. CLSI, 2007
- **CCS** (Clinical Cytometry Society):
 - Davis et al: 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasias. Clin Cytometry, 72B, 2007.
- **ESCCA** (European Society for Clinical Cell Analysis: www.escca.eu)
- **European Leukemia Net** (www.leukemia-net.org)

EuroFlow

- Το European LeukemiaNet και το EuroFlow προτείνουν την χρησιμοποίηση μιας σειράς επιλεγμένων δεικτών ή ενός συγκεκριμένου panel 8πλού φθορισμού για την διάγνωση της ΟΜΛ καθώς και της ΟΛ με μικτό φαινότυπο (MPAL: mixed phenotype acute leukemia)

PANEL ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΟΛ



Consensual Mandatory Acute Leukemia Diagnosis Panel (27)

For quick orientation or paucicellular samples

- cCD3, MPO, cCD79a, TdT (5)
- CD7, CD2, CD10, CD19, CD22 (s or c), sIg, CD13, CD33, CD34 (5)
- CD45 for gating purposes (28,47)

Sublineage classification and definition of clinical entities (also with adapted gating strategy)

- DR, CD1a, CD4, CD5, CD8, CD3 (m), IgM (c), CD14, CD117, CD56, CD65, CD41 or CD61, RBC marker such as CD238 (glycophorin A) or CD36.

EuroFlow

TABLE 1. Single tube EuroFlow screening combinations for acute leukemias (ALOT)*

Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
cyCD3	CD45	cyMPO	cyCD79a	CD34	CD19	CD7	smCD3

Multi-tube EuroFlow classification panel for AML/MDS

Responsible scientist: VHJ van der Velden

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

Multi-tube EuroFlow classification panel for AML/MDS (Part 2)

Responsible scientist: VHJ van der Velden

Tube	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Aim**
AML/ MDS 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, mast cell and plasmacytoid dendritic cell lineages
AML-M7 7	HLADR	CD45	CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9	Characterization of AML-M7, mastocytosis

PANEL ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΟΜΛ

- Συνιστάται η χρησιμοποίηση σε όλα τα σωληνάρια δύο τουλάχιστον δεικτών που χαρακτηρίζουν τον βλαστικό πληθυσμό όπως το CD45 και το CD34.
- Προτείνεται η χρησιμοποίηση ενός περιορισμένου panel αρχικά με συνδυασμούς κυρίως κυτταροπλασματικών δεικτών (cyMPO, cyCD3, cyCD79a) που θα ξεκαθαρίσουν αν πρόκειται για ΟΜΛ ή ΟΛΛ. (mandatory/orientation panel)
- Στην συνέχεια με ένα ευρύτερο panel δεικτών :
 - ✓ καθορίζεται η σειρά στην οποία ανήκουν τα βλαστικά κύτταρα καθώς και το στάδιο ωρίμανσης τους.
 - ✓ αναγνωρίζονται τα διάφορα άτυπα πρότυπα έκφρασης των λευχαιμικών κυττάρων της ΟΜΛ.
 - ✓ καταγράφονται οι σχετιζόμενοι με την λευχαιμία ανοσοφαινότυποι (Leukemia Associated Immunophenotypes, LAIPs)
 - ✓ αναζητούνται ανοσοφαινοτυπικά προφίλ (π.χ ΟΠΛ) ή έκτοπη έκφραση δεικτών (π.χ CD2, CD19, NG2) που σχετίζονται με συγκεκριμένες γενετικές ανωμαλίες.
 - ✓ Εκτιμάται η έκφραση δεικτών που έχουν προγνωστική σημασία (πχ CD56) ή που αποτελούν στόχους θεραπείας (πχ CD33, CD123)

ΑΝΤΙΓΩΝΑ (CD) ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟ PANEL ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΟΜΛ

Table 6. Reagents of clinical utility in the evaluation of maturing myeloid and monocytic neoplasms

Reagent	Normal distribution	Clinical utility in myeloid and monocytic neoplasms	Comments
CD11b	Maturing neutrophilic and monocytic cells, some lymphoid cells.	May be aberrantly expressed in AML, MDS, and MPD.	—
CD13	Neutrophilic and monocytic cells.	Indicator of neutrophilic and monocytic lineage in acute leukemia. May be aberrantly expressed in AML, MDS, and MPD.	
CD14	Monocytes.	Indicator of monocytic differentiation.	Not a sensitive marker of immature monocytes.
CD15	Maturing neutrophilic cells and monocytes.	May be aberrantly expressed in AML, MDS, and MPD.	—
CD16	Maturing neutrophilic cells, monocytes and NK cells.	May be aberrantly expressed in AML, MDS, and MPD.	—
CD33	Neutrophilic and monocytic cells.	May be aberrantly expressed in AML, MDS, and MPD.	Some normal variability in intensity of expression.
CD34	B-cell and T-cell precursors and myeloblasts.	Identification and enumeration of blasts.	Not all blasts are CD34 ⁺ .
CD45	All B cells (weaker intensity on precursors and plasma cells), all T cells (weaker intensity on precursors).	Identification of blasts (CD45 gating often with low orthogonal (side) light scatter).	—
CD56	NK cells and NK-like T cells.	May be aberrantly expressed in AML, MDS, and MPD.	Low level of expression on regenerating normal neutrophilic and monocytic cells and with growth factor stimulation.
CD117	Immature neutrophilic cells and mast cells.	Identification myeloblasts and mast cells.	May be present in myeloma and some T-cell neoplasms.
HLA-DR	Myeloblasts, monocytes, all B cells, activated T cells.	Identification of promyelocytes, such as in APL. May be aberrantly expressed in AML, MDS, and MPD.	Non-APL AML may also be negative.
CD2*	T cells, NK cells.	May be aberrantly expressed in AML; some association with inv16. May be aberrantly expressed in systemic mastocytosis.	—
CD4*	T-cell subset, monocytic.	Often positive in AML, particularly with monocytic differentiation.	Also mature T-cell neoplasms and HDN.
CD7*	T cells and NK cells.	May be aberrantly expressed in AML, MDS, and MPD.	

CD36*	Monocytes, erythroid cells, megakaryocytes and platelets.	When used in combination with CD64 is a more sensitive marker of monocytic differentiation than CD14.	—
CD38*	Precursor B cells (hematogones), normal follicle center B cells, immature and activated T cells, plasma cells (bright intensity), myeloid and monocytic cells, and erythroid precursors.	Identification of early bone marrow progenitor cell populations for further evaluation of phenotypic abnormalities.	—
CD41*	Megakaryocytes and platelets.	Megakaryocytic differentiation.	May detect nonspecific binding of platelet proteins to other cells such as monocytes.
CD61*	Megakaryocytes and platelets.	Megakaryocytic differentiation.	May detect nonspecific adherence of platelet proteins to other cells such as monocytes. Sometimes combined with CD42b to distinguish platelets from blasts.
CD61, cytoplasmic*	Megakaryocytes and platelets.	Megakaryocytic differentiation.	May demonstrate fewer problems with adherence of platelet proteins.
CD64*	Monocytes and intermediate neutrophilic precursors.	Identification of monocytic differentiation. May be aberrantly expressed in AML, MDS, and MPD.	Gained on mature neutrophils with sepsis.
CD71*	Erythroid precursors (bright), myeloid, activated lymphoid, proliferating cells.	Identification of immature erythroid cells. Possibly expressed in MDS.	—
cMPO*	Neutrophilic and monocytic cells.	Indicator of myeloid differentiation.	In contrast to cytochemical stain, measures the presence of antigen, not enzyme activity.
CD117*	Immature neutrophilic cells and mast cells.	Identification myeloblasts.	May be expressed by cells more mature cells than blasts.
CD123*	Monocytes, neutrophils, basophils, megakaryocytes, and plasma cytotid dendritic cells (bright).	Identification HDN. Positive some AML, especially with monocytic differentiation.	Plasmacytoid dendritic cells may be increased in some reactive conditions such as Castleman disease and Kikuchi lymphadenitis and in association with MPD.
CD163*	Monocyte, macrophage.	Indicator of monocytic differentiation.	—
CD235a*	Erythroid precursors.	Indicator of erythroid maturation.	Not present on some immature erythroid precursors.

blood

2008 111: 3941-3967
Prepublished online January 15, 2008;
doi:10.1182/blood-2007-11-120535

Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms

Fiona E. Craig and Kenneth A. Foon

Εκφραση δεικτών για την διάγνωση της ΟΜΛ

Δείκτες αωρότητας: CD34, CD133, CD38, HLA-DR

- **cyMPO**: ο πιο ειδικός δείκτης της μυελικής σειράς
- **CD117** : δείκτης που χαρακτηρίζει τα άωρα κύτταρα της μυελικής αλλά εκφράζεται και στα μαστοκύτταρα και σπάνια στις T-ΟΜΛ
- **CD13,CD33**: δείκτες της μυελικής σειράς , μπορεί να εκφράζονται άτυπα σε βλαστικά κύτταρα της Β σειράς.
- **CD15, CD65**: δείκτες που εκφράζονται στα ώριμα κύτταρα της μυελικής σειράς
- **CD14, CD64, CD35, CD36, IREM2, cyLysozyme** : δείκτες που χαρακτηρίζουν την μονοκυτταρική σειρά. Ο δείκτης CD14 συνήθως δεν εκφράζεται στους μονοβλάστες, ενώ ο δείκτης CD64 εκφράζεται ασθενώς στα ουδετερόφιλα και έντονα στα μονοκύτταρα.
- **CD11c, CD11b**: μόρια προσκόλλησης που εκφράζονται στα ώριμα κύτταρα της μυελικής και μονοκυτταρικής σειράς.
- **CD123**: δείκτης που εκφράζεται στα ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, μεγακαρυοκύτταρα, βασεόφιλα και στα pDC bright
- **CD16** : εκφράζεται στα ουδετερόφιλα
- **CD36,CD71, CD235a** : Δείκτες που χαρακτηρίζουν την ερυθρά σειρά
- **CD61, CD41, CD42** : Δείκτες που χαρακτηρίζουν την μεγακαρυοκυτταρική σειρά

LEUKEMIA ASSOCIATED IMMUNOPHENOTYPES- LAIPs

Η μεγάλη ετερογένεια που χαρακτηρίζει την ΟΜΛ αντανakλάται και στην μεγάλη **ποικιλία άτυπων προτύπων έκφρασης αντιγόνων** που συναντούμε στον ανοσοφαινότυπο των λευχαιμικών κυττάρων.

- Οι συχνότερες ατυπίες που περιγράφονται στην ΟΜΛ είναι οι εξής:
 1. **Ασύγχρονη έκφραση δεικτών:** ταυτόχρονη έκφραση άωρων και ώριμων δεικτών στο ίδιο κύτταρο (π.χ συνέκφραση του CD34 και του CD15)
 2. **Έκφραση ενός δείκτη άλλης κυτταρικής σειράς :** έκφραση δεικτών της λεμφικής σειράς στους βλάστες της μυελικής σειράς (π.χ συνέκφραση CD2, CD5, CD7, CD10, CD19).
 3. **Υπερέκφραση ενός δείκτη :** παθολογικά αυξημένη έκφραση ενός αντιγόνου
 4. **Απουσία έκφρασης ειδικών για την σειρά δεικτών :** απουσία του CD13 ή/και του CD33 από τους μυελοβλάστες
 5. **Μη αναμενόμενα σκεδαστικά χαρακτηριστικά :** έκφραση λεμφικών δεικτών σε κύτταρα με υψηλό FSC/SSC που αντιστοιχούν στα φυσιολογικά κύτταρα της μυελικής σειράς.

• Η χρησιμοποίηση της πολυπαραμετρικής ανάλυσης έδειξε ότι σε κάθε ασθενή με ΟΜΛ μπορεί να αναγνωριστούν **>1 LAIP στην διάγνωση**.

• Οι LAIPs που ανιχνεύονται στην διάγνωση πρέπει να καταγράφονται γιατί αποτελούν το «**ανοσολογικό αποτύπωμα**» της συγκεκριμένης ΟΜΛ το οποίο χρησιμεύει για την παρακολούθηση του ασθενούς και την ανίχνευση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (MRD).

Δείκτες και ανοσοφαινοτυπικά προφίλ που καθοδηγούν την μοριακή μελέτη στην ΟΜΛ

Ανοσοφαινοτυπικά προφίλ που σχετίζονται με γενετικές ανωμαλίες

SSC high
CD34-HLADR-
CD15- CD11b-
CD117+CD33++
CD13+ MPO+



APL
PML RARA

CD34-HLADR+/-
CD15+CD117+
CD33++CD13+
CD123+ MPO+



NPM1

CD2



INV16

APLvar
PML RARA

CD19



t(8;21)

NG2



11q23
MLL
rearranged

Δείκτες που η έκφραση τους στα κύτταρα της μυελικής σειράς σχετίζεται με γενετικές ανωμαλίες

Δείκτες άλλων σειρών που μπορεί να εκφράζονται στους βλάστες της ΟΜΛ

CD7

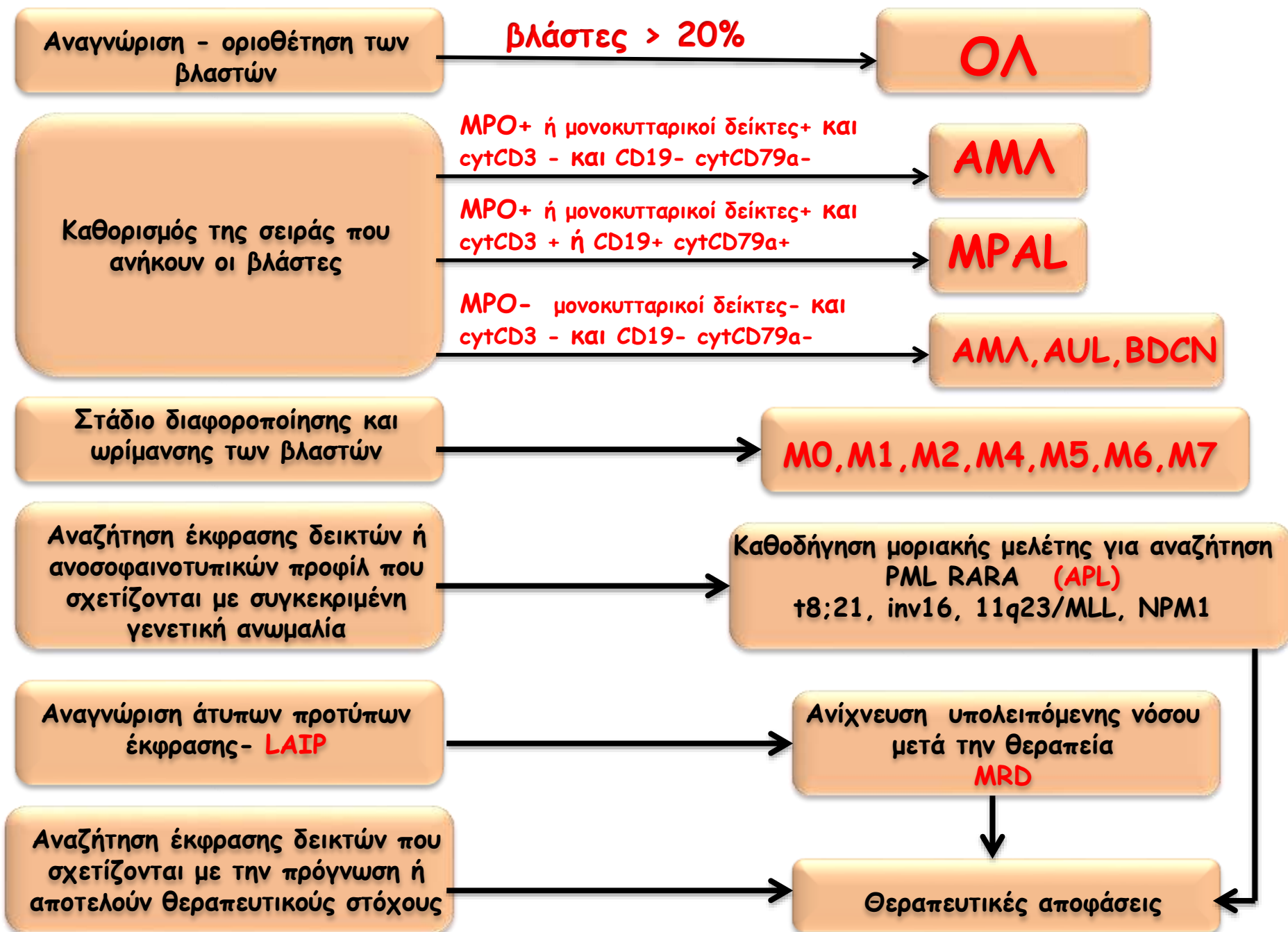
- Δείκτης της Τ λεμφικής σειράς και των ΝΚ
- Ο πιο συχνός έκτοπος δείκτης στην ΟΜΛ (25-37%)
- Συνήθως M0, M1, M2 αλλά και M7
- Ποτέ στην Οξεία Προμυελοκυτταρική Λευχαιμία
- Συχνά σε ΟΜΛ από εκτροπή MDS
- Πρέπει να ελέγχεται αν cytCD3-

TdT

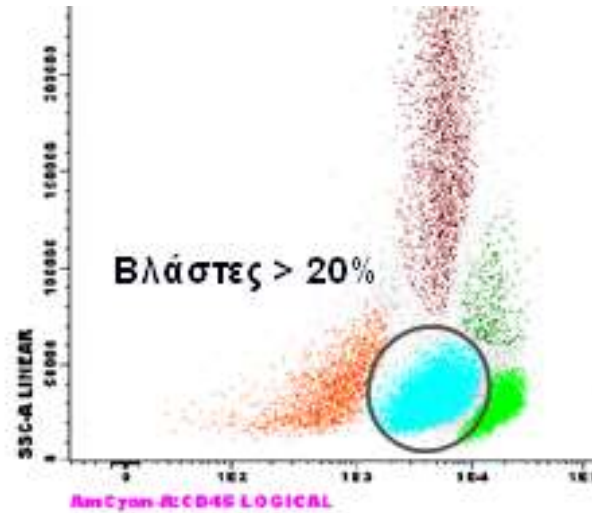
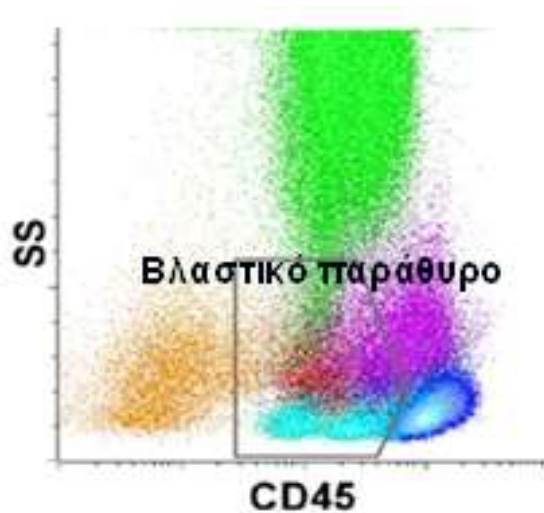
- Δείκτης που εκφράζεται προσωρινά στον πυρήνα κατά τη διαφοροποίηση των Τ και Β λεμφοκυττάρων
- Εκφράζεται έκτοπα στο 10% των ΟΜΛ
- Συνήθως M0 (50%), M1
- Στην M2 με t(8;21) σε συνδυασμό με CD19 και CD56 οπότε θα πρέπει να ελέγχεται αν cytCD22-

CD56

- Δείκτης που εκφράζεται στα ΝΚ και στα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα
- Εκφράζεται ασθενώς στα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα κατά την χορήγηση αυξητικού παράγοντα (G-CSF)
- Εκφράζεται στο 10-30% των ΟΜΛ
- Η έκφραση του σχετίζεται με αντοχή στην θεραπεία, εξωμυελική εντόπιση και κακή πρόγνωση.
- Εκφράζεται στο BPDN
- Εκφράζεται σε μη αιμοποιητικούς όγκους που διηθούν τον μυελό (νευροβλάστωμα)



Αναγνώριση και οριοθέτηση βλαστικού πληθυσμού στην ΟΜΛ



- Αναγνώριση του βλαστικού πληθυσμού από το στικτόγραμμα CD45/SSC
 - Υπολογισμός του ποσοστού των βλαστών για να καθοριστεί αν πρόκειται για ΟΛ.
> 20% βλάστες στο περιφερικό αίμα ή στον μυελό. (WHO, 2001,2008)
- Εξαίρεση αποτελούν οι ΟΜΛ με $t(8;21)$, $t(15;17)$, $inv(16)$, $t(16;16)$ και η ερυθρολευχαιμία.
- Όλα τα CD34+ κύτταρα είναι βλάστες / Όλοι οι βλάστες δεν είναι CD34+

Μέθοδος εκλογής για τον υπολογισμό του % των βλαστών είναι η μορφολογία

Αναγνώριση και οριοθέτηση βλαστικού πληθυσμού στην ΟΜΛ

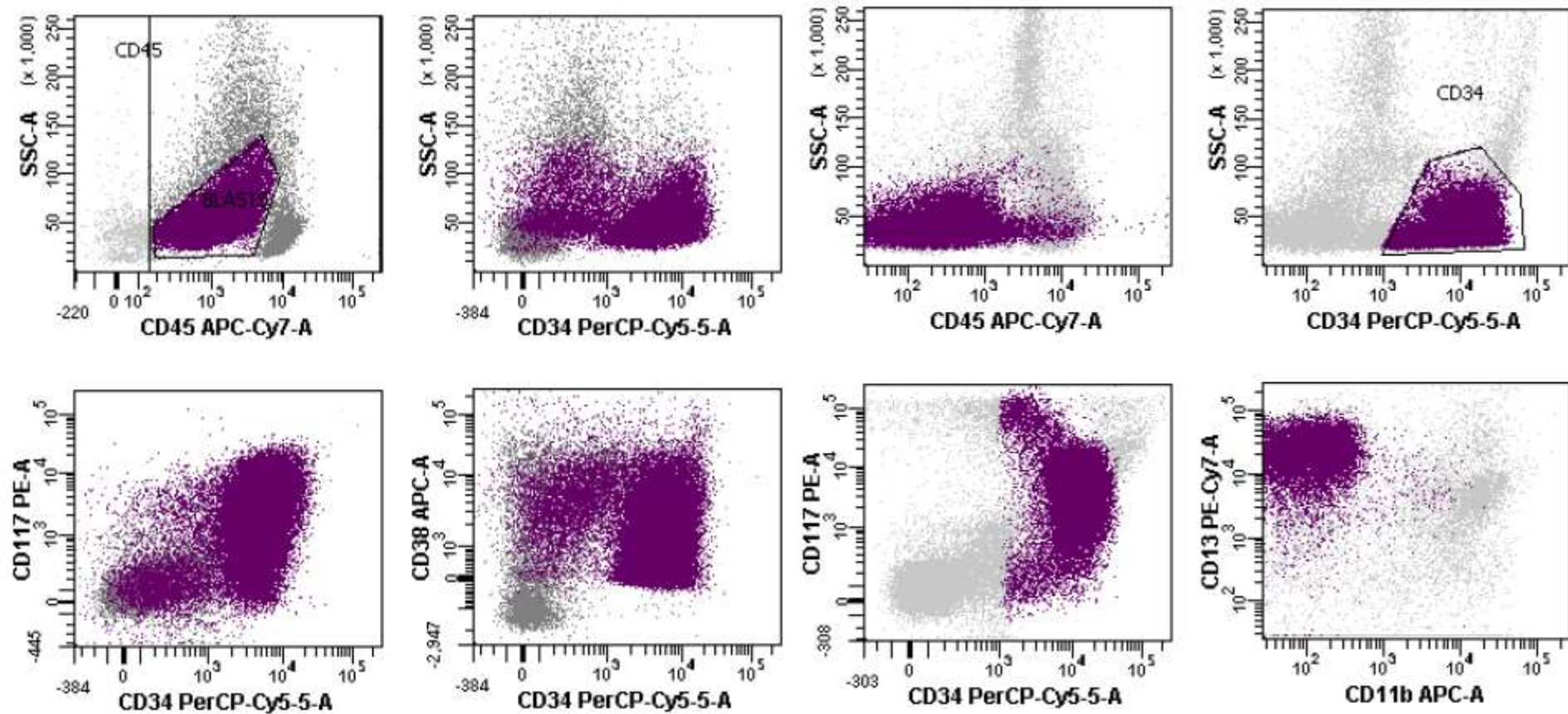
Οι βλάστες στην ΟΜΛ μπορεί να ...

- είναι **CD45dim** (ή CD45-) και **SSC low** και να εκφράζουν δείκτες αωρότητας: **CD34+CD38+HLA-DR+** ή/και **CD117+**
- είναι **CD34 - CD117+**
- είναι **CD34 - CD117- CD45+ SSC inter/high**
- παρουσιάζουν **ετερογένεια** δηλαδή οι δείκτες αωρότητας να εκφράζονται σε ένα μέρος του πληθυσμού ενώ το υπόλοιπο να εκφράζει δείκτες ωρίμανσης.
- Προσοχή στις ΟΜΛ με ΜΔΣ τύπου αλλοιώσεις, όπου μπορεί λόγω της δυσπλασίας (υποκοκκίωση) ώριμα κύτταρα της μυελικής ή μονοκυτταρικής σειράς να πέφτουν στο βλαστικό παράθυρο.
- Προσοχή στην αναγνώριση των βασεόφιλων που μπορεί στο στικτόγραμμα CD45 SSC να βρίσκονται στο βλαστικό παράθυρο με αποτέλεσμα την υπερεκτίμηση του % των βλαστών.

Καθορισμός Θετικότητας ενός δείκτη στον βλαστικό πληθυσμό

- Ένας δείκτης θεωρείται **Θετικός** όταν εκφράζεται σε ποσοστό **> 20%** του υπό μελέτη πληθυσμού.
- Για αντιγόνα που χαρακτηρίζουν αωρότητα όπως είναι το **CD34, CD117, TdT** το όριο θετικότητας είναι το **10%**.
- Για την **MPO** θεωρείται ότι ισχύει το αναφερόμενο όριο 10% αλλά στις περιπτώσεις που δεν εκφράζονται άλλοι δείκτες της μυελικής ή ειδικοί δείκτες της Β ή Τ λεμφικής σειράς η ανεύρεση ποσοστού βλαστικών κυττάρων **>3%** που εκφράζουν MPO αρκεί για να χαρακτηριστεί ή ΟΛ σαν ΟΜΛ ή ΜΡΑΛ με μυελικό στοιχείο.

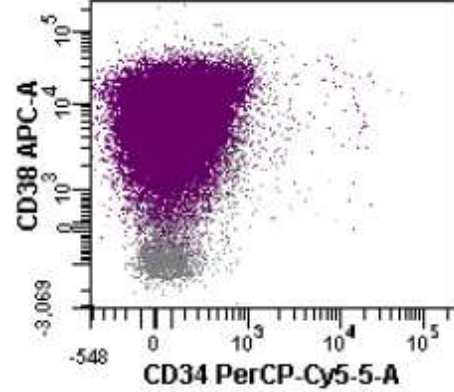
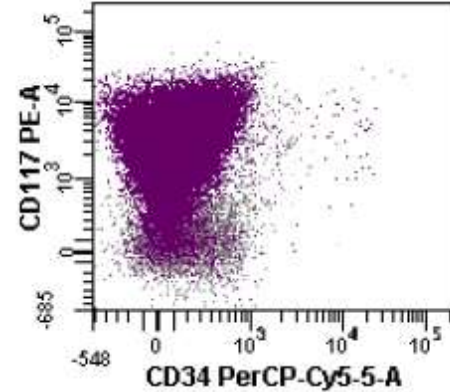
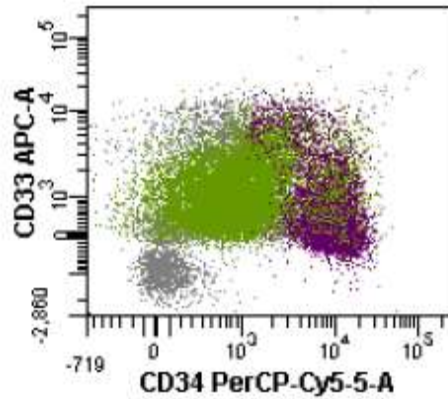
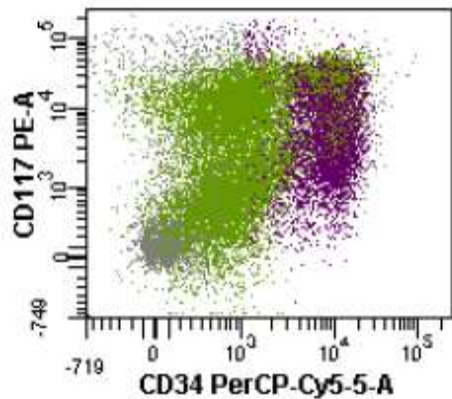
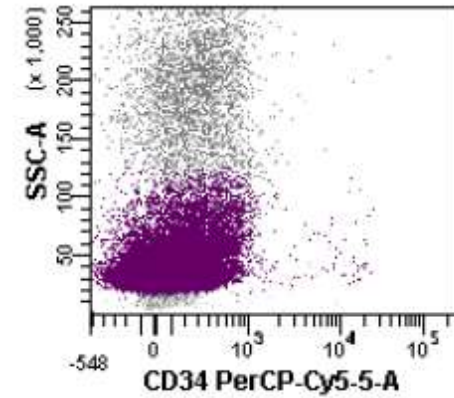
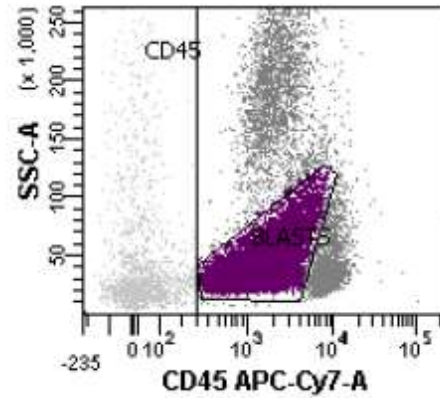
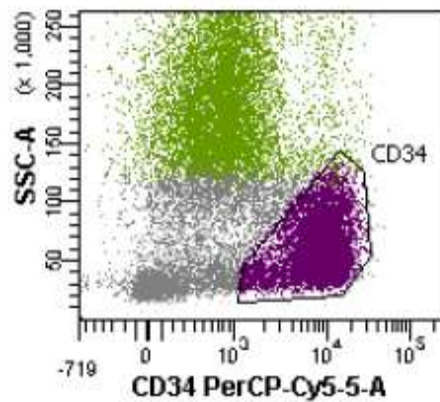
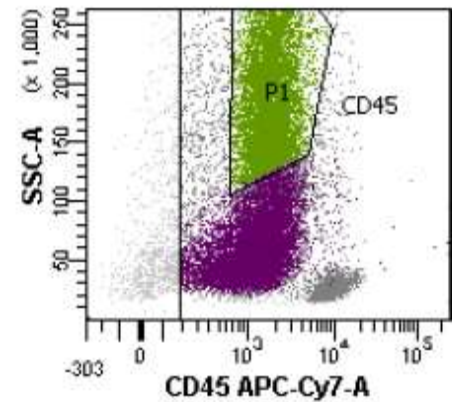
Αναγνώριση και οριοθέτηση βλαστικού πληθυσμού στην ΟΜΛ



Οι βλάστες είναι **CD45^{dim}**
SSC^{low}
CD34⁺CD117⁺

Οι βλάστες είναι **CD45⁻**
SSC^{low}
CD34⁺CD117⁺

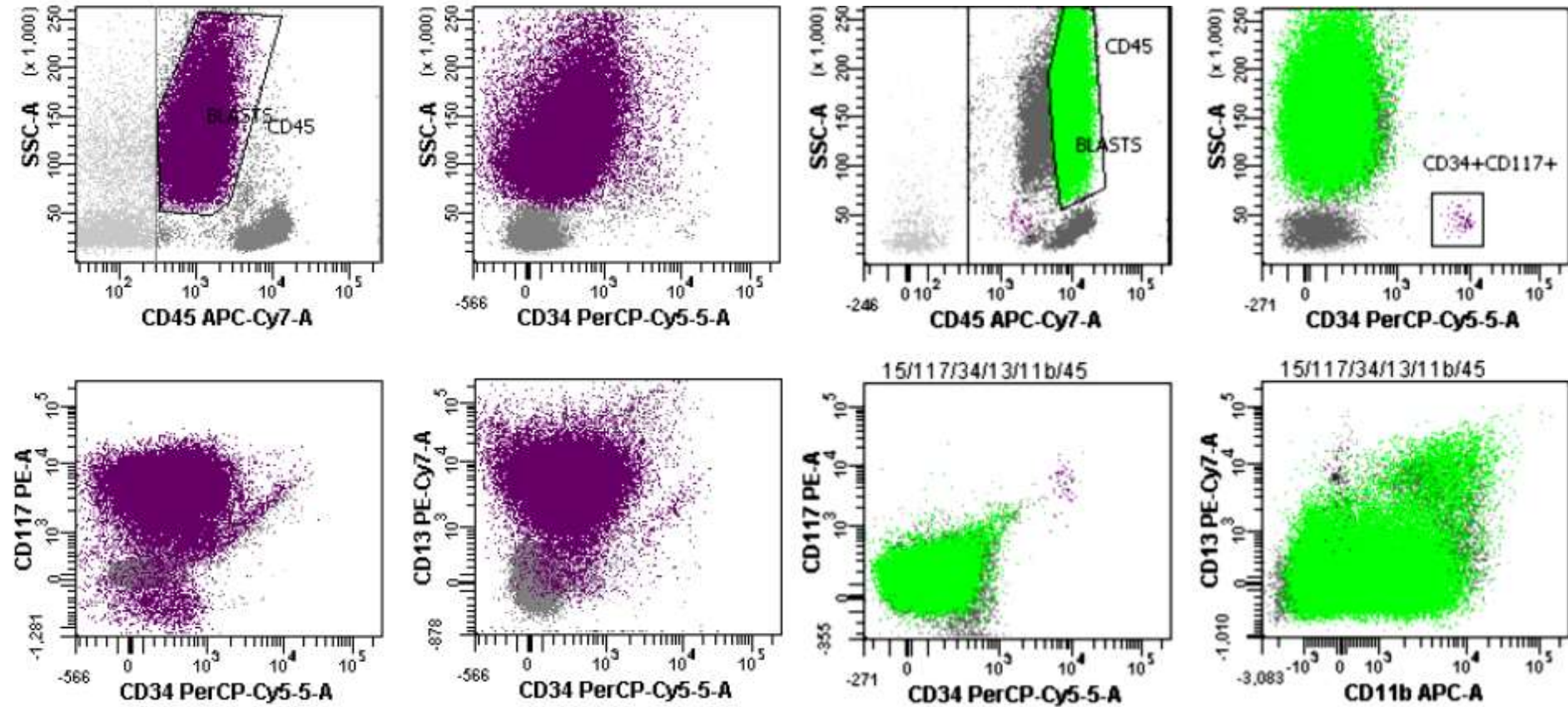
Αναγνώριση και οριοθέτηση βλαστικού πληθυσμού στην ΟΜΛ



Οι βλάστες είναι **CD45dim**
SSC inter/high
και παρουσιάζουν ετερογένεια

Οι βλάστες είναι **CD45dim**
SSC inter
CD34 - CD117+

Αναγνώριση και οριοθέτηση βλαστικού πληθυσμού στην ΟΜΛ



Οι βλάστες είναι **CD45dim**
SSC high
CD34- CD117+

Οι βλάστες είναι **CD45++**
SSC high
CD34- CD117-

ΟΜΛ -NOS

- **Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία με ελάχιστη διαφοροποίηση: (FAB- M0)**

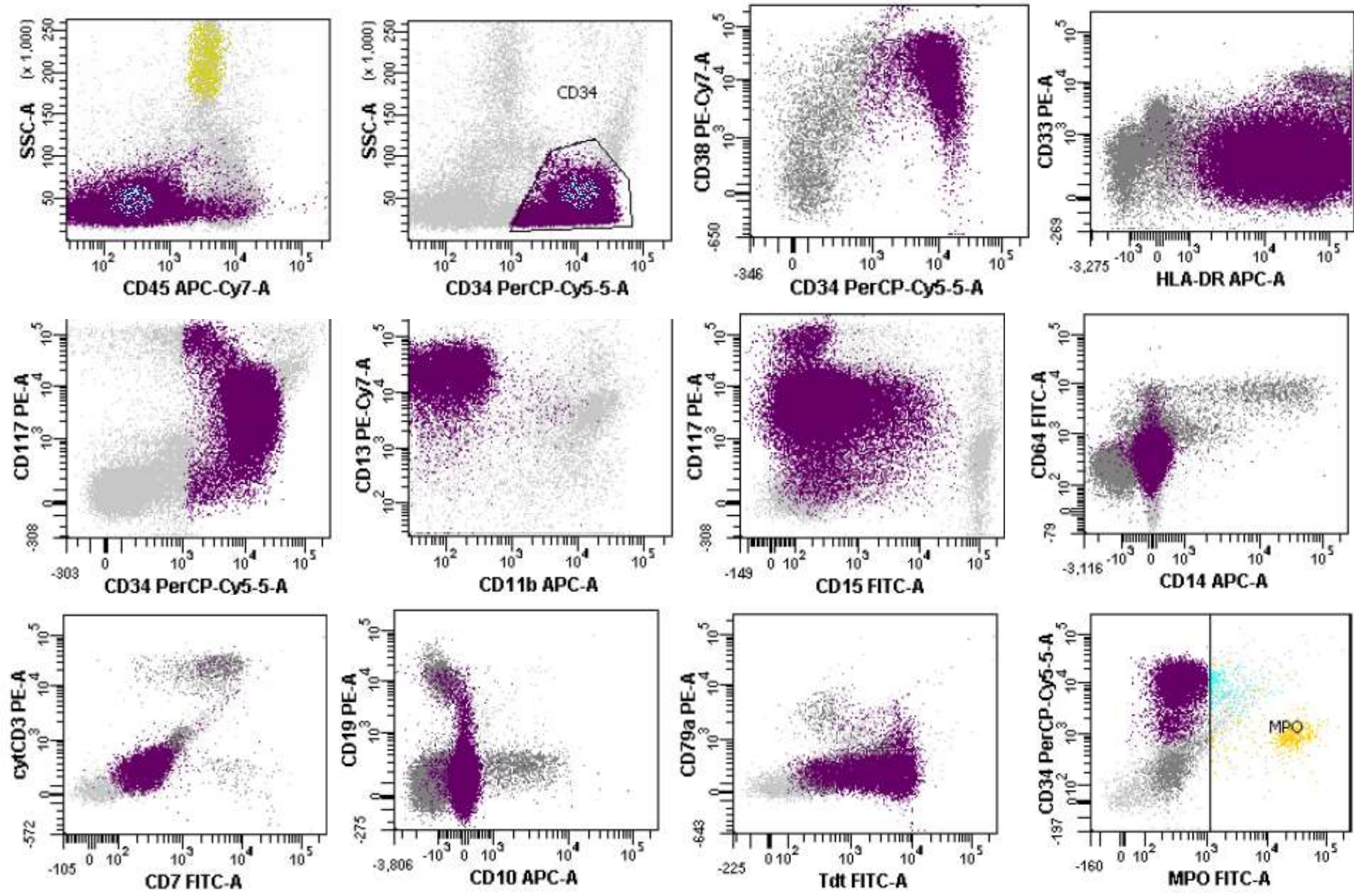
- ✓ δεν υπάρχουν μορφολογικές ή κυτταροχημικές αποδείξεις μυελικής διαφοροποίησης
- ✓ οι βλάστες εκφράζουν μόνο δείκτες αωρότητας : CD34+CD38+HLA-DR+
- ✓ δεν εκφράζουν δείκτες μυελικής ή μονοκυτταρικής ώριμανσης (CD15,CD14,CD11b,CD64)
- ✓ δεν εκφράζουν ειδικούς δείκτες της Β και Τ σειράς
- ✓ μπορεί να εκφράζουν CD117 ή/και CD13 , TdT, CD7.
- ✓ η ΜΡΟ αρνητική στην κυτταροχημική χρώση αλλά ανιχνεύεται κυτταροπλασματικά σε ένα μικρό ποσοστό (< 3%) των βλαστών με κυτταρομετρία.

- **Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία χωρίς ωρίμανση: (FAB- M1)**

- ✓ οι βλάστες εκφράζουν ΜΡΟ και δείκτες μυελικής διαφοροποίησης CD13,CD33,CD117 καθώς και CD34 και HLA-DR.
- ✓ δεν εκφράζουν δείκτες μυελικής ή μονοκυτταρικής ώριμανσης (CD15,CD14,CD64)
- ✓ δεν εκφράζουν ειδικούς δείκτες της Β και Τ σειράς
- ✓ μπορεί να εκφράζουν CD7

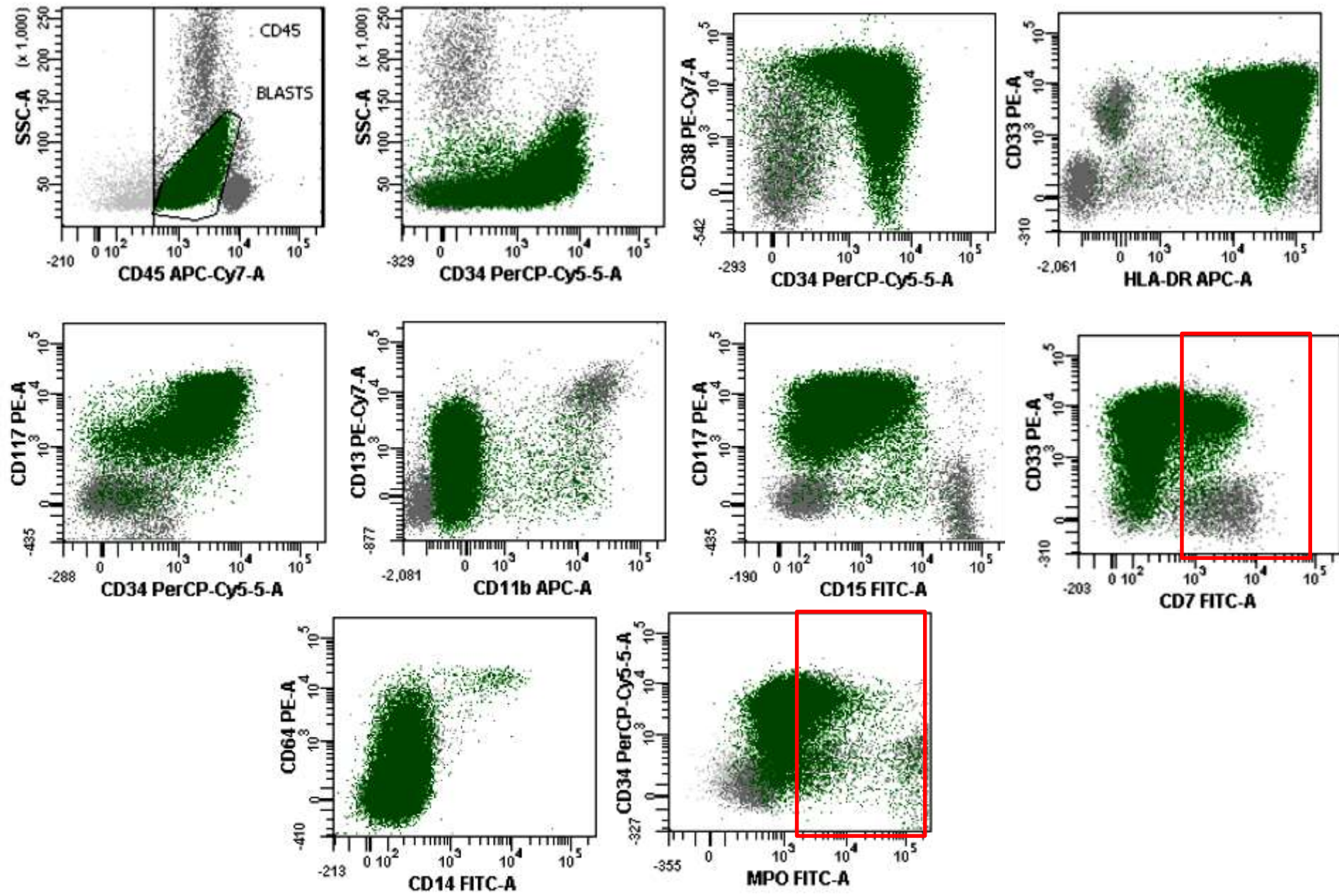
ΟΜΛ με ελάχιστη διαφοροποίηση -ΜΟ

CD45-/dim CD34+CD38+HLA-DR+CD117+CD13+CD33- Tdt+ MPO+ (στο 2,6% των βλαστών)



ΟΜΛ χωρίς ωρίμανση -M1

CD45dim CD34+CD38+HLA-DR+CD117+CD13+CD33+MPO+(>3%) CD7dim



ΟΜΛ -NOS

- **Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία με ώριμανση: (FAB- M2)**

✓ οι βλάστες εκφράζουν MPO και δείκτες μυελικής διαφοροποίησης CD13,CD33, καθώς και δείκτες μυελικής ώριμανσης (CD15,CD11b). Συνήθως εκφράζουν επίσης HLA-DR, CD34 ή/ και CD117

✓ δεν εκφράζουν δείκτες μονοκυτταρικής ώριμανσης CD14, CD64 και το μονοκυτταρικό στοιχείο στα εμπύρηνια κύτταρα του μυελού είναι < 20%

- **Οξεία Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία : (FAB- M4)**

✓ οι βλάστες παρουσιάζουν ετερογένεια και αποτελούνται από ένα πληθυσμό που εκφράζει δείκτες μυελικής διαφοροποίησης (CD13, CD33, CD15) και έναν πληθυσμό που εκφράζει δείκτες μονοκυτταρικής διαφοροποίησης (CD14, CD64, CD36, CD4, CD11b, CD68, lysozyme) . Εκφράζουν HLA-DR ενώ η MPO εκφράζεται ασθενώς.

✓ Συχνά υπάρχει και πληθυσμός πιο άωρων βλαστών CD34 + ή/και CD117+

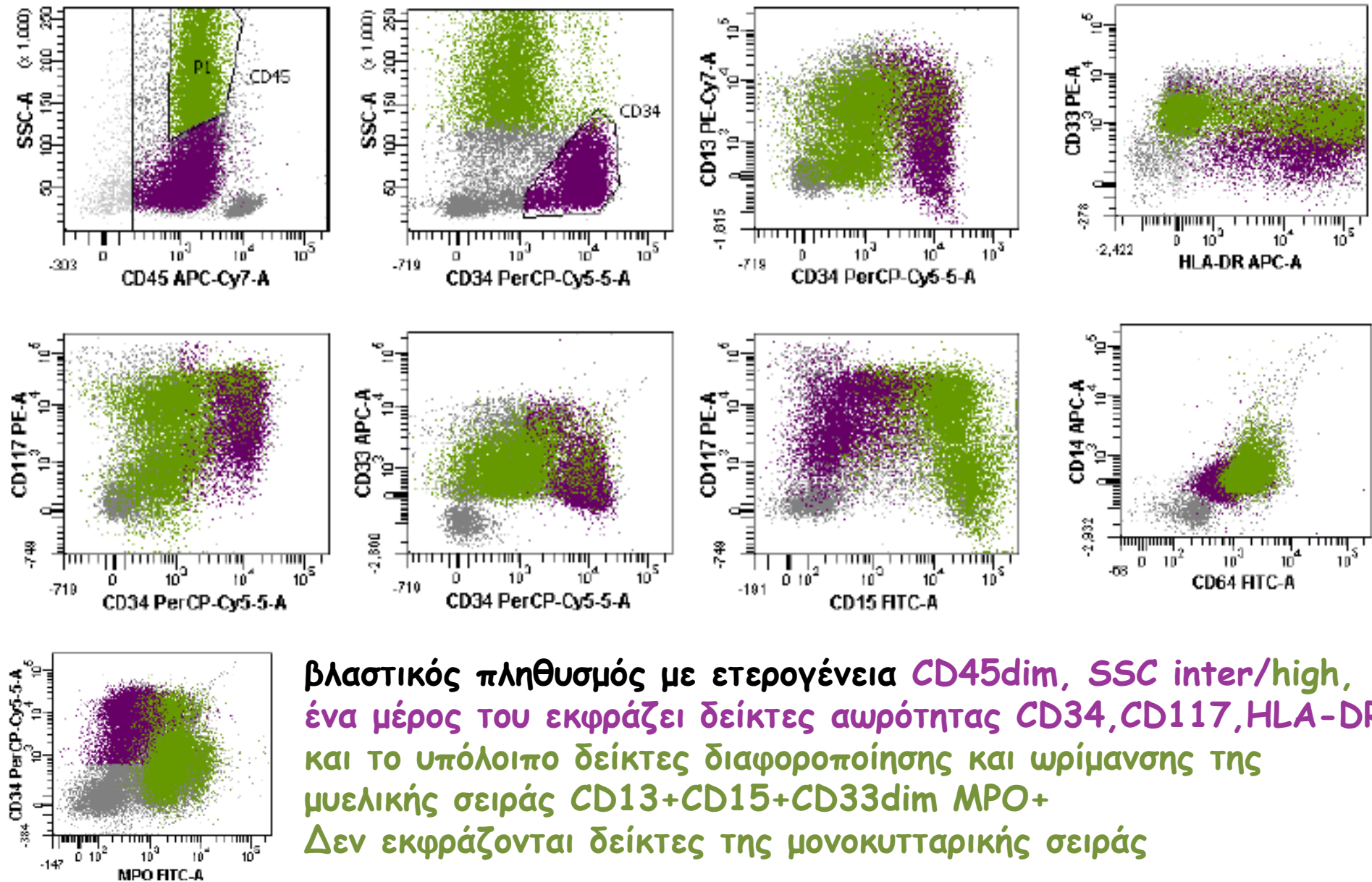
- **Οξεία Μονοβλαστική και Οξεία Μονοκυτταρική Λευχαιμία : (FAB- M5)**

✓ 80% των βλαστών ανήκουν στην μονοκυτταρική σειρά (**M5α** οξεία μονοβλαστική > 80% μονοβλάστες , **M5β** οξεία μονοκυτταρική κυρίως προμονοκύτταρα)

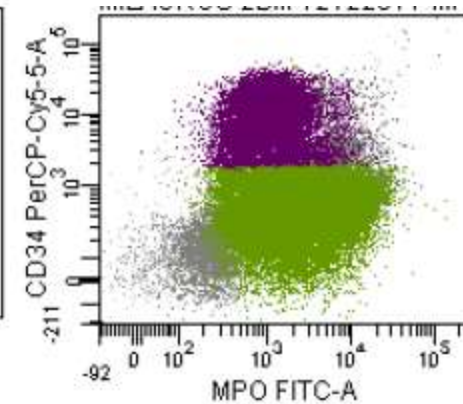
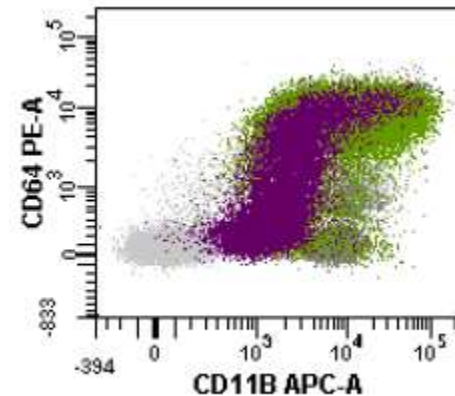
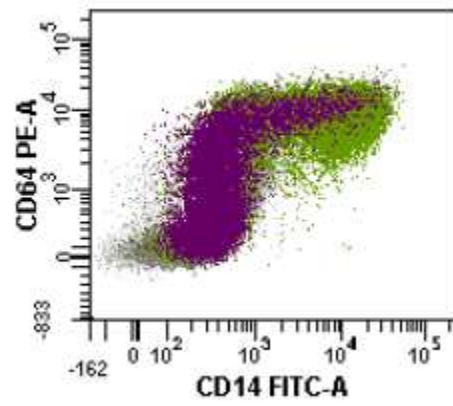
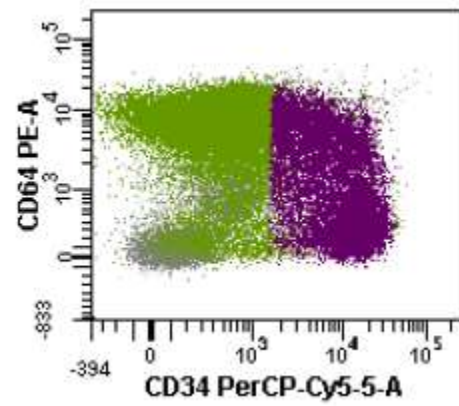
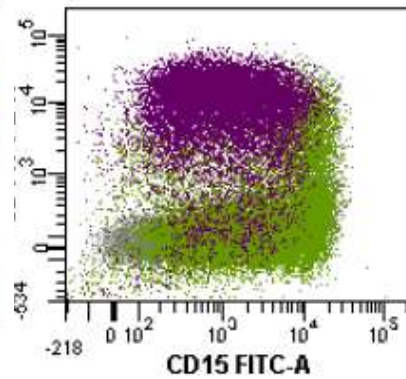
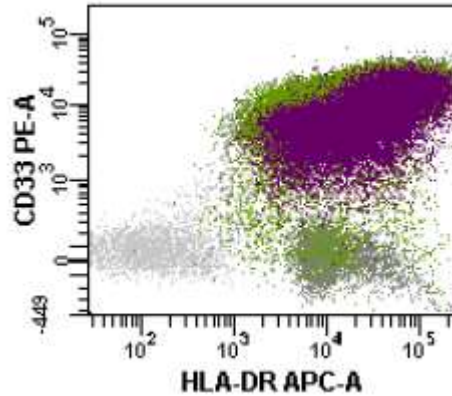
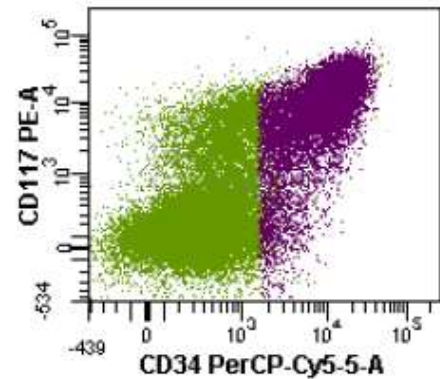
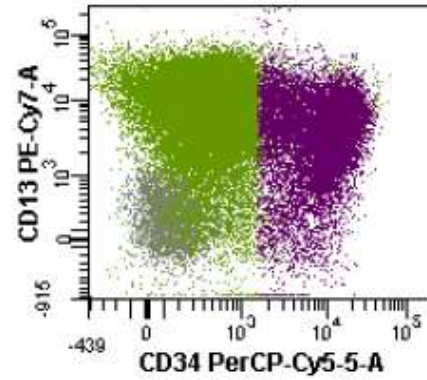
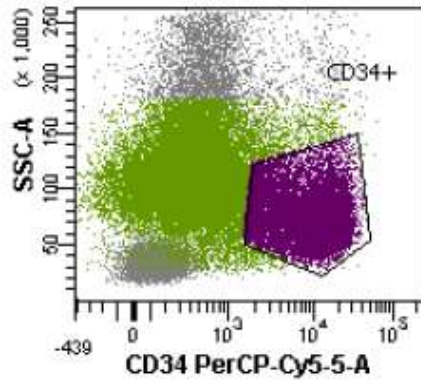
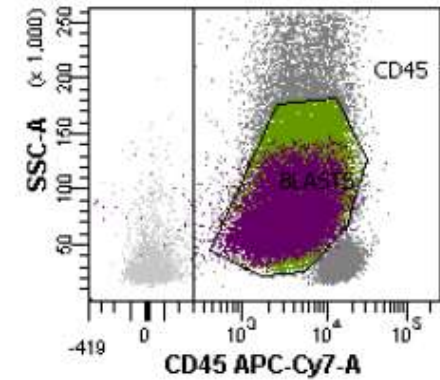
✓ οι βλάστες εκφράζουν CD13, CD33bright, CD15 , CD14, CD64, CD68, CD36, CD4, CD11b, lysozyme, HLA-DR ενώ MPO εκφράζεται στην μονοκυτταρική.

✓ Συνήθως εκφράζουν CD117, σπανιότερα CD34 ενώ μπορεί να εκφράζουν CD56.

ΟΜΛ με ωρίμανση -M2

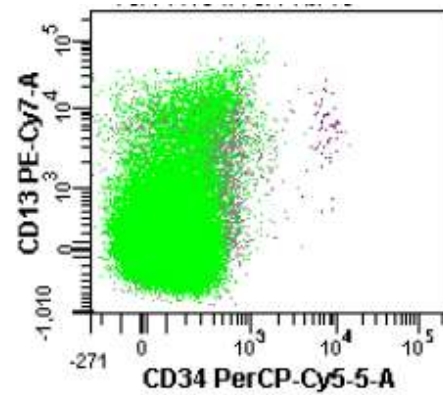
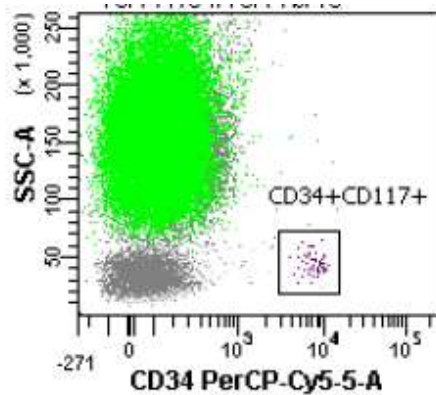
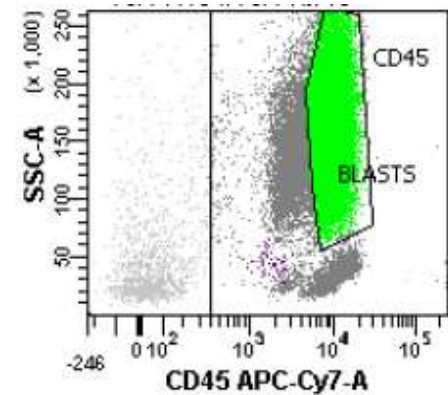


ΟΜΛ μυελομονοκυτταρική -M4

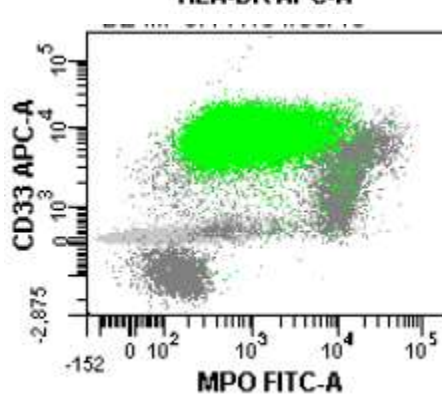
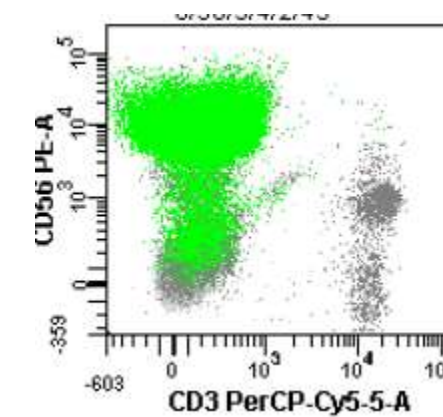
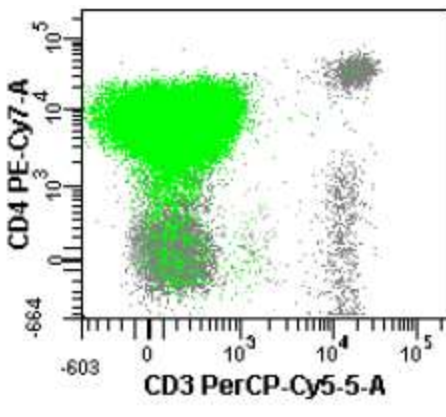
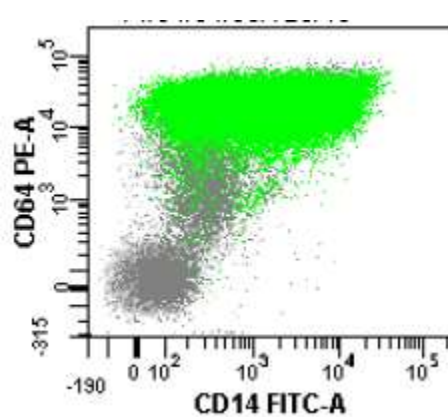
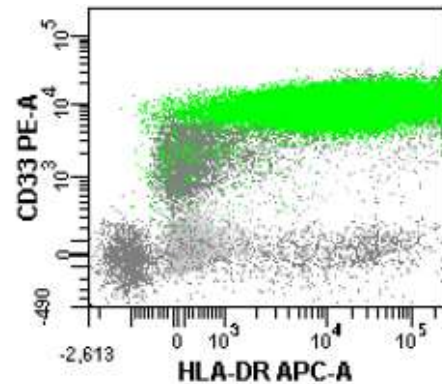
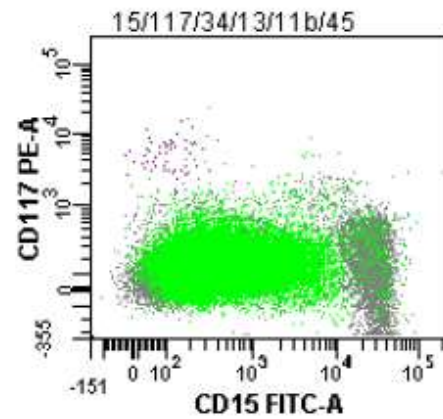
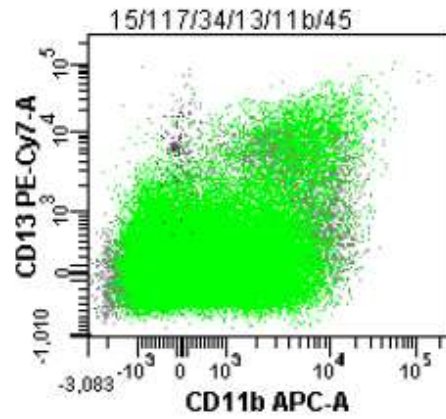
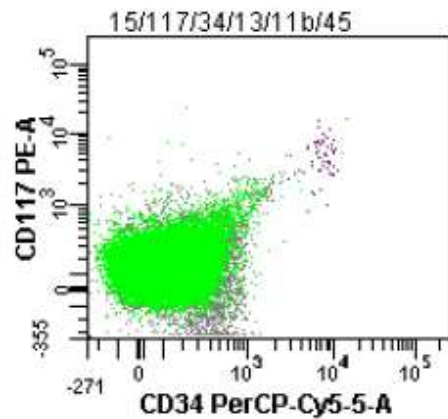


βλαστικός πληθυσμός με
ετερογένεια:
CD45dim, SSC inter/high,
ένα μέρος εκφράζει
δείκτες μυελικής
CD13+CD15+CD33bright
και δείκτες αωρότητας
CD34+CD117+HLA-DR+
και το υπόλοιπο δείκτες
μονοκυτταρικής σειράς
CD14+CD64+CD11b+
Η MPO εκφράζεται
ασθενώς

ΟΜΛ μονοκυτταρική -M5



Ομοιόμορφος βλαστικός πληθυσμός :
CD45+, SSC high, που εκφράζει δείκτες της μονοκυτταρικής σειράς CD14+CD64+CD11b+ και CD15, CD33bright HLA-DR+ CD4+CD56+ Δείκτες αωρότητας δεν εκφράζονται



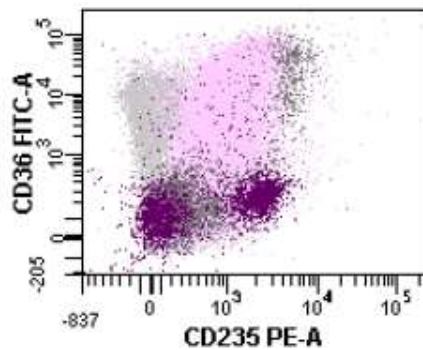
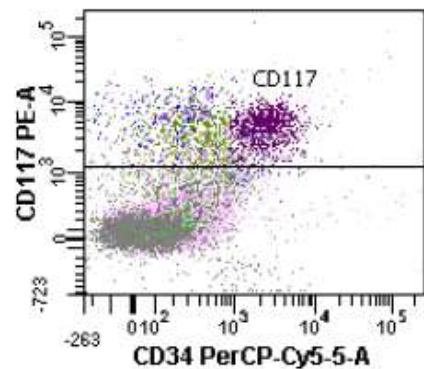
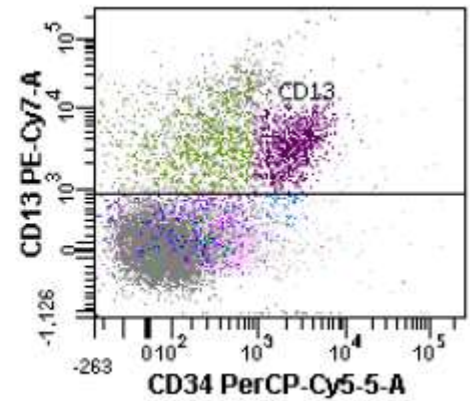
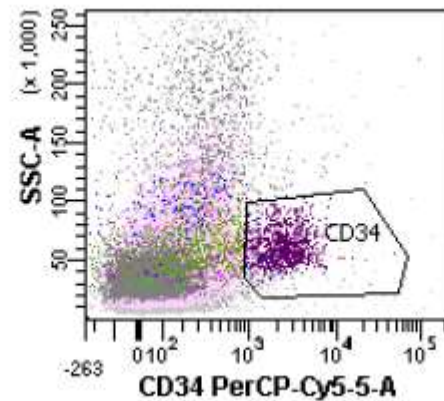
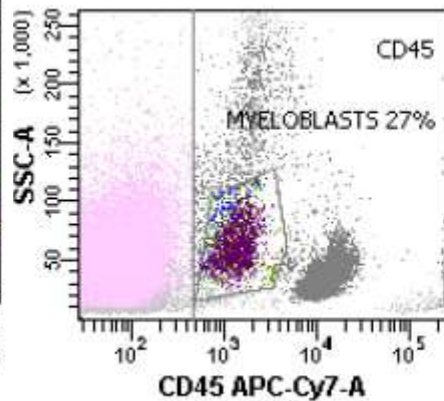
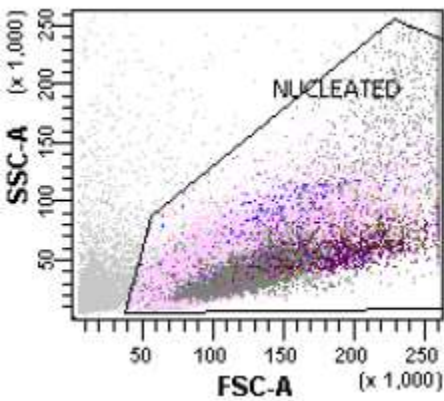
- **Οξεία Λευχαιμία της Ερυθράς σειράς (FAB- M6)**

- ✓ Ερυθρολευχαιμία : > 50% των εμπυρήνων κυττάρων του μυελού ανήκουν στην ερυθρά σειρά και > 20% των CD45+ κυττάρων είναι βλάστες της μυελικής σειράς.
- ✓ Αληθής λευχαιμία της ερυθράς σειράς : > 80% των εμπυρήνων κυττάρων του μυελού ανήκουν στην ερυθρά σειρά (προερυθροβλάστες) χωρίς μυελοβλάστες.
- ✓ οι βλάστες είναι CD45-/dim CD34 - HLA-DR - MPO - αλλά μπορεί να εκφράζουν CD117. Εκφράζουν δείκτες που χαρακτηρίζουν την ερυθρά σειρά CD235a, CD71, CD36, CD105. Το CD235a μπορεί να μην εκφράζεται στους πιο άωρους ερυθροβλάστες.

- **Οξεία μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία (FAB- M7)**

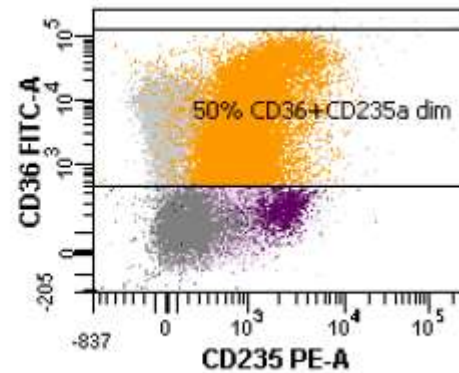
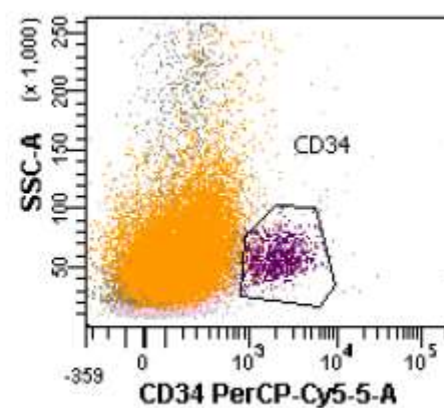
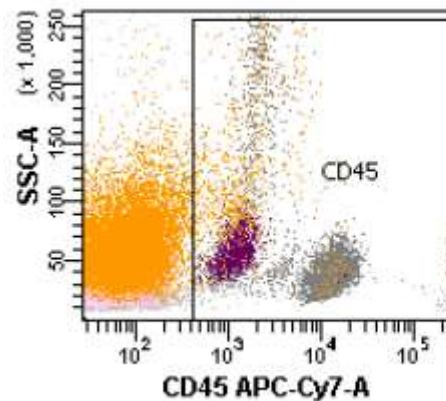
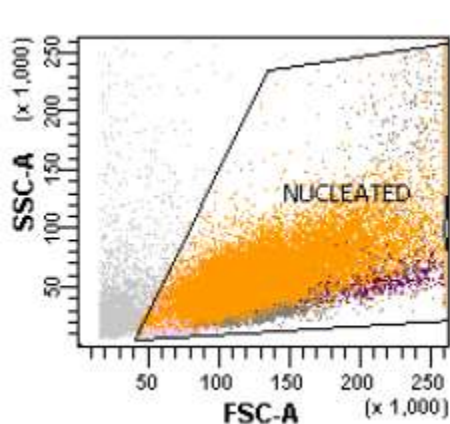
- ✓ βλάστες >20% εκ των οποίων > 50% ανήκουν στην μεγακαρυοβλαστική σειρά
- ✓ οι βλάστες είναι CD45-/dim CD34 - HLA-DR - MPO -. Εκφράζουν μία ή περισσότερες γλυκοπρωτείνες των αιμοπεταλίων συνήθως CD41 ή/και CD61, (σπανιότερα CD42), CD36 και μπορεί να εκφράζουν CD13, CD33 και σπάνια CD7.
- ✓ συστήνεται η χρησιμοποίηση του συνδυασμού CD61/CD64 ή η κυτταροπλασματική χρώση του CD61 για την αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων από την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στα μονοκύτταρα .

ΕΡΥΘΡΟΛΕΥΧΑΙΜΙΑ - M6



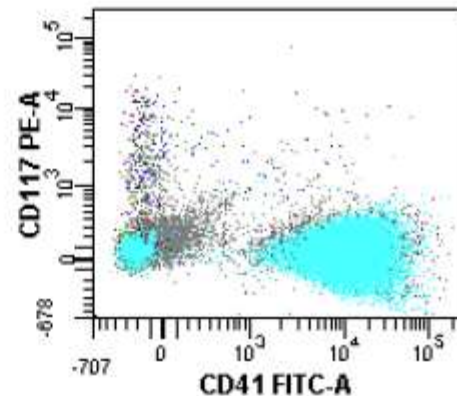
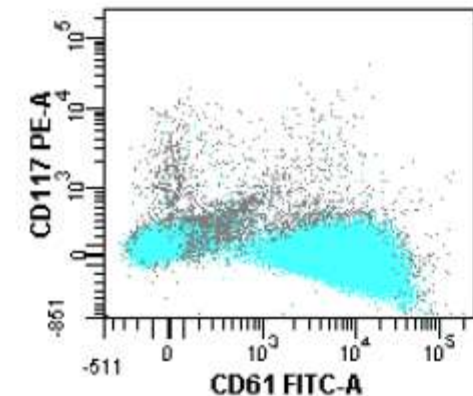
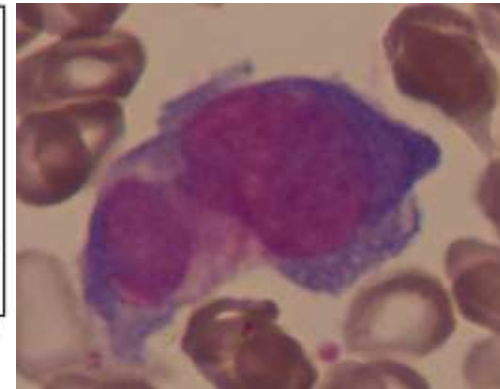
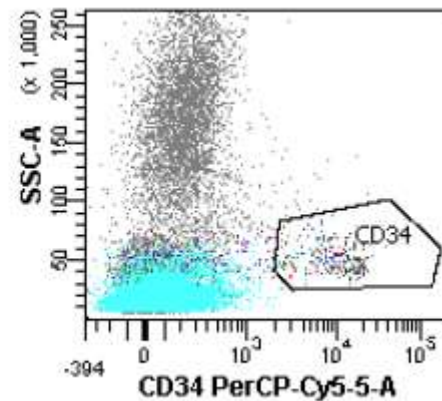
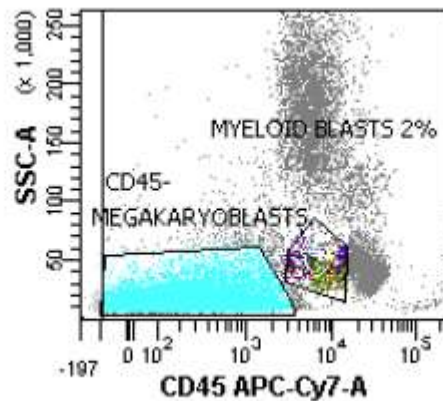
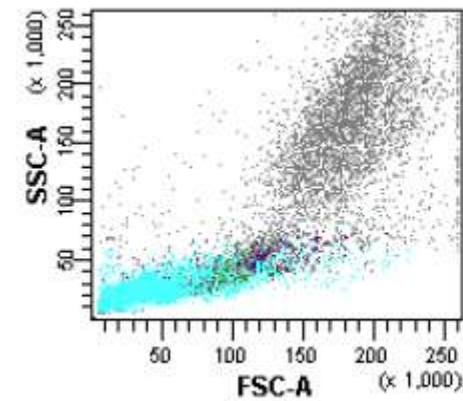
27% βλάστες της μυελικής σειράς στα CD45+
CD45dim CD34+CD117+CD13+

50% βλάστες της ερυθράς σειράς στα εμπύρρινα
CD45-CD36+CD235a+

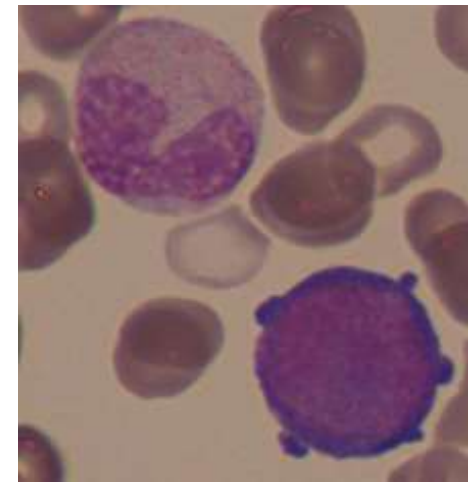
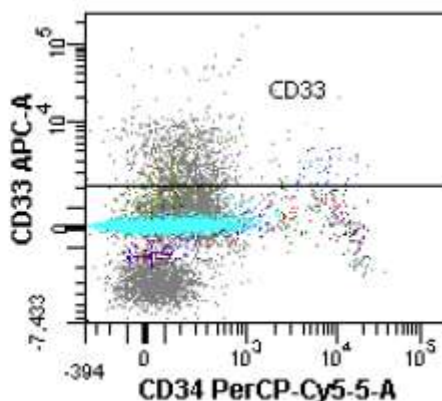
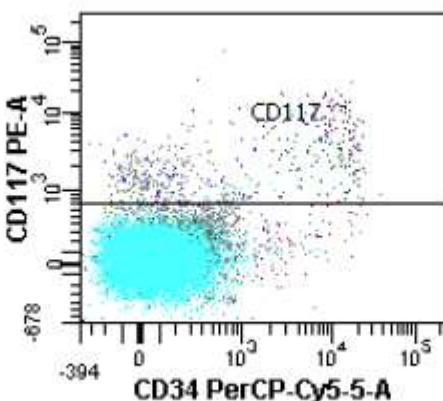
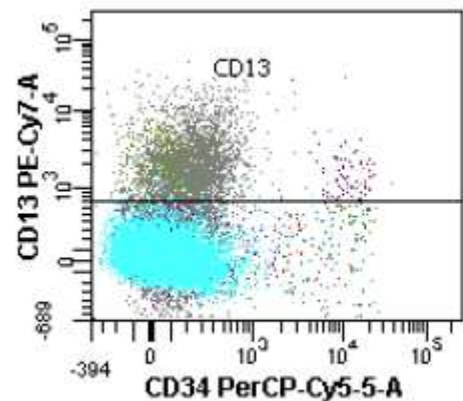


ΟΞΕΙΑ ΜΕΓΑΚΑΡΥΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ - M7

Περιφερικό αίμα



βλαστικός πληθυσμός >20% των εμπυρήνων
CD45- SSC low, που εκφράζουν δείκτες
της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς CD61 ,
CD41, ενώ δεν εκφράζουν δείκτες
αωρότητας .



- **Οξεία βασεοφιλική λευχαιμία**

- ✓ Πολύ σπάνια λευχαιμία
- ✓ οι βλάστες εκφράζουν CD123, CD203c, CD11b, CD9, δείκτες της μυελικής CD13 ή/και CD33 και σε μερικές περιπτώσεις CD22 ή/και TdT
- ✓ Μπορεί να εκφράζουν CD34 αλλά αντιθέτως από τα φυσιολογικά βασεόφιλα είναι HLA-DR+ CD117-
- ✓ Δεν εκφράζουν MPO.

- **Οξεία Μαστοκυτταρική Λευχαιμία**

- ✓ Πολύ σπάνια λευχαιμία
- ✓ οι βλάστες εκφράζουν CD117 bright, CD2, CD25, tryptase, CD9
- ✓ Μπορεί να εκφράζουν CD33 αλλά είναι CD34- HLA-DR-
- ✓ Δεν εκφράζουν MPO

- **Μυελικές λευχαιμίες σχετιζόμενες με το σύνδρομο Down**

- ✓ Παροδική ανώμαλη μυελοποίηση: διαταραχή που εμφανίζεται μόνο στα νεογέννητα με σύνδρομο Down. Οι βλάστες έχουν μορφολογικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς.

- ✓ Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία: Είναι συνήθως **οξεία μεγακαρυοβλαστική** λευχαιμία με χαρακτηριστικό ανοσοφαινότυπο. Οι βλάστες είναι CD13+, CD33+, CD117+CD7+CD4+CD41+CD61+CD42+CD36+ CD71+ και MPO - CD15 - CD14 - CD235a- .

- **Οξεία πανμύελωση με μυελοίνωση**

- ✓ οι βλάστες εκφράζουν δείκτες της μυελικής CD13 , CD33, CD117 καθώς και CD34.

- ✓ Συνυπάρχουν άωρα κύτταρα της ερυθράς και μεγακαρυοκυτταρικής σειράς.

- **Μυελοειδές σάρκωμα**

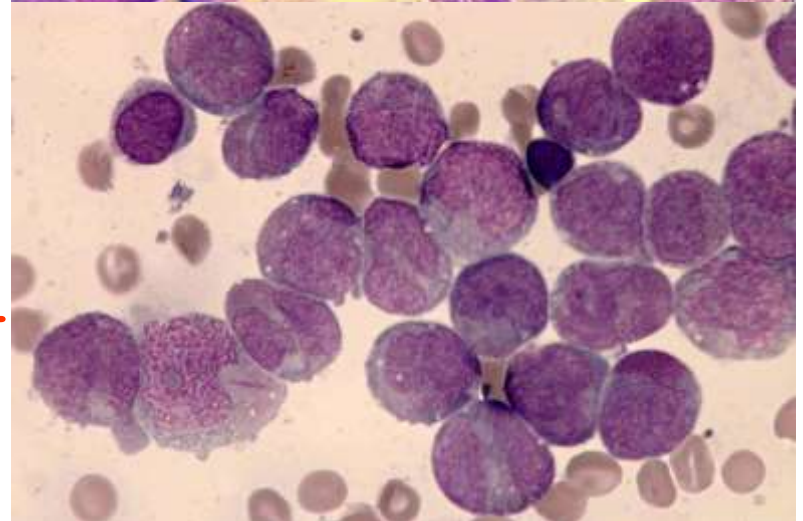
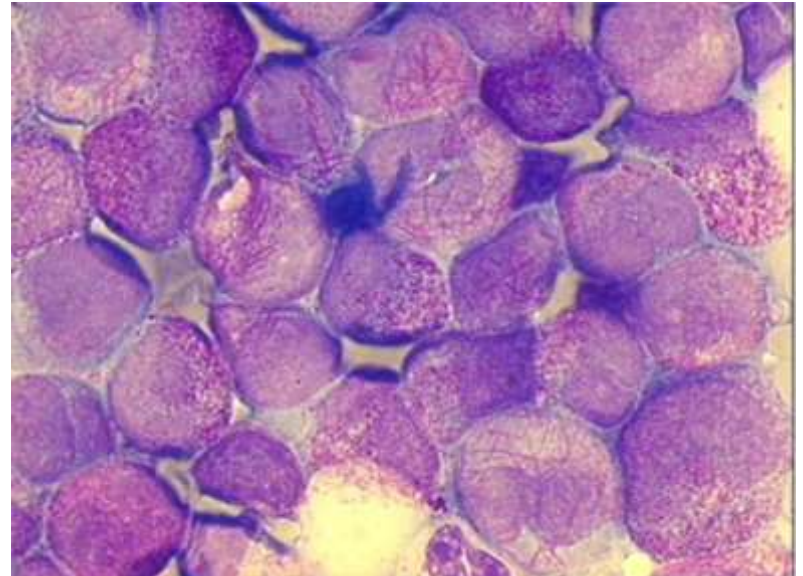
- ✓ Μάζα που βρίσκεται σε μια οποιαδήποτε ανατομική θέση εκτός του μυελού και αποτελείται από βλάστες της μυελικής ή μονοκυτταρικής σειράς με ή χωρίς ωρίμανση.

- ✓ Στο παρακέντημα υπάρχουν βλάστες της μυελικής (CD13,CD33,CD117,MPO) ή της μονοκυτταρικής σειράς (CD14, CD163, CD68, CD11C)

Οξεία Προμυελοκυτταρική Λευχαιμία- APL

+ (15;17)(q22;q21), PML/RARα^{pos}

- FAB: OML-M3
 - Συνήθως εμφανίζεται σαν επείγον περιστατικό (ΔΕΠ)
 - Θεραπεία: ATRA
 - Η ταχύτατη αναγνώριση ενός χαρακτηριστικού ανοσοφαινοτυπικού προφίλ με κυτταρομετρία ροής:
 - ✓ κατευθύνει την μοριακή μελέτη για αναζήτηση του PML/RARα
 - ✓ Επισπεύδει την έναρξη της κατάλληλης θεραπείας.
- ❖ Δεν αρκεί η ανεύρεση CD34- HLA-DR- μυελοβλαστών για να χαρακτηριστεί μία OML σαν OPL



ΟΞΕΙΑ ΠΡΟΜΥΕΛΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ- APL

+ (15;17)(q22;q21), PML/RAR α ^{pos}

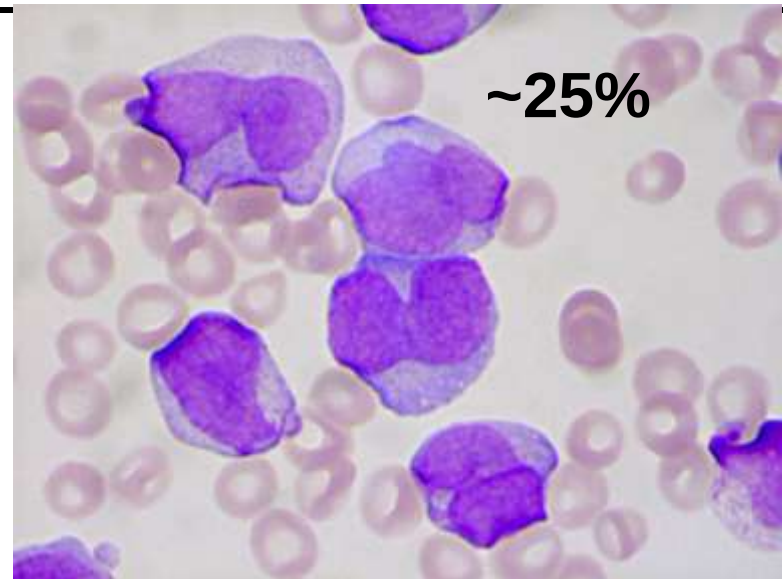
Hypergranular type



- HLA-DR- CD133-CD34-
- CD11a-CD11b-CD18-
- CD15-/dim CD65-/dim
- CD45dim CD38dim
- CD117-/dim
- CD13+CD33++MPO++

Χαμηλά WBC

Microgranular type (APLv)

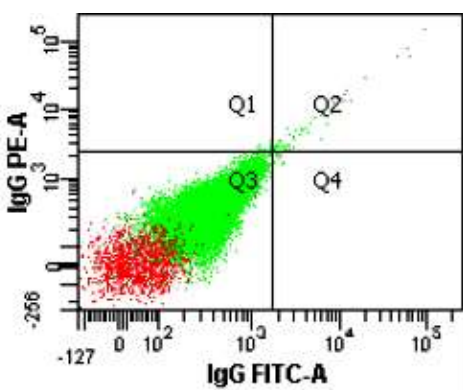
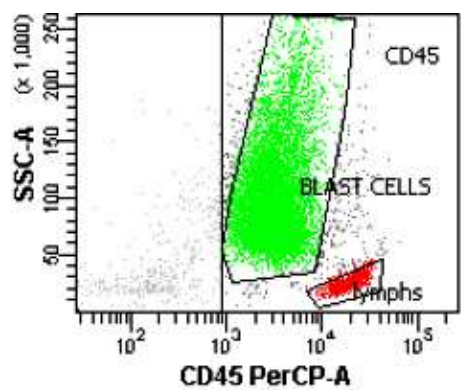
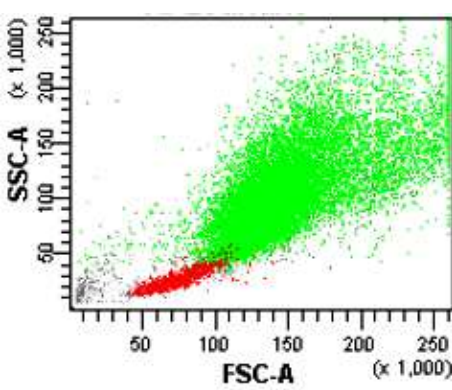


- HLA-DR-/dim CD34-/++dim
- CD11a-CD11b-CD18-
- CD15-/dim CD65-/dim
- CD45+ CD38dim
- CD117-/++dim
- CD13+CD33++MPO++
- CD2+ή/και CD56+

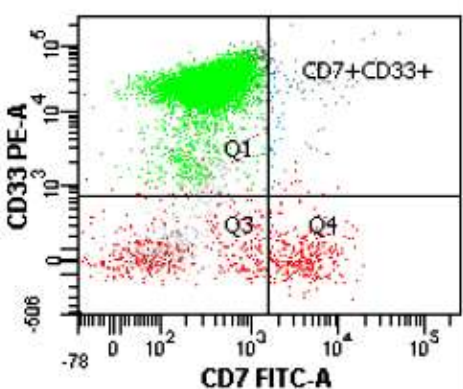
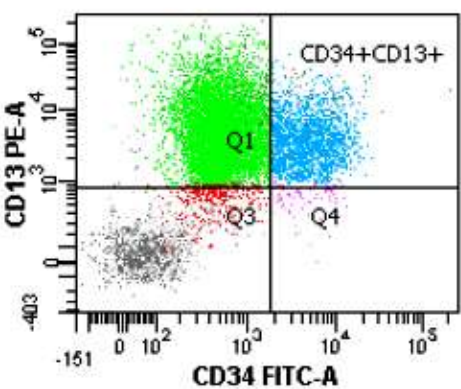
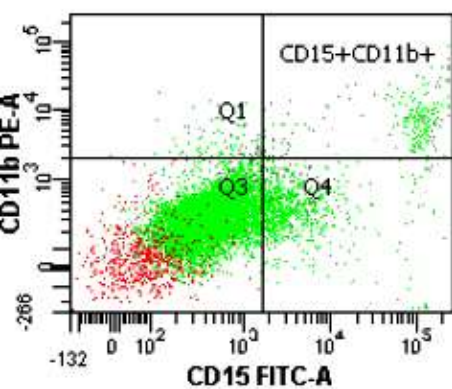
Ψηλά WBC 50,000 - 200,000/ μ L

Ανοσοφαινοτυπικό Προφίλ Οξείας Προμυελοκυτταρικής Λευχαιμίας- ΟΠΛ (APL)

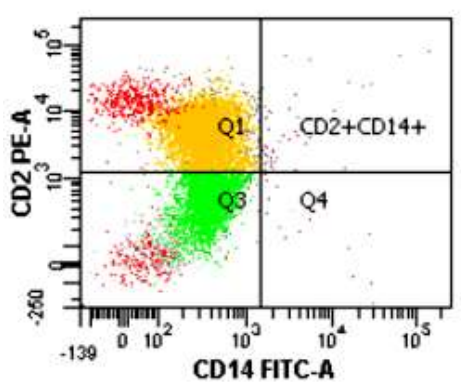
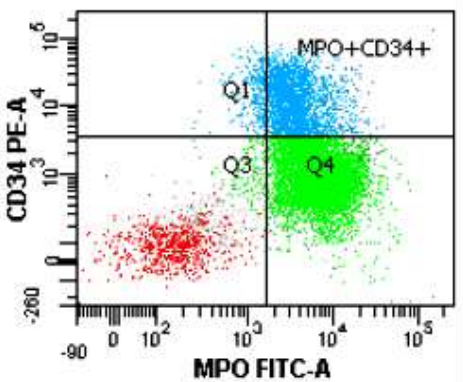
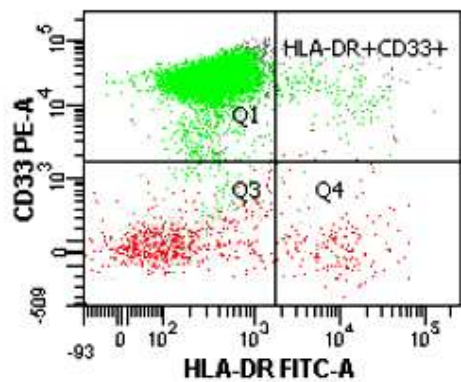
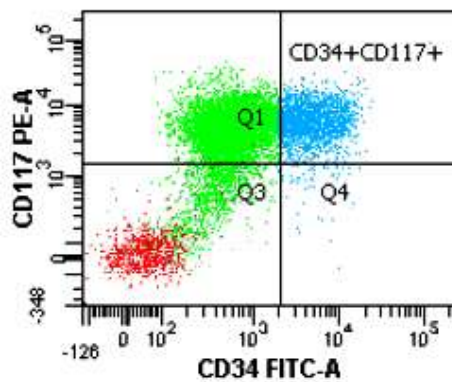
CD45+SSChigh CD34-/part CD117+/dim CD13heterCD33++MPO+ CD15-CD11b-HLA-DR-



Προσοχή
στην εκτίμηση της
έκφρασης των δεικτών
λόγω αυτοφθορισμού
των κυττάρων της ΟΠΛ



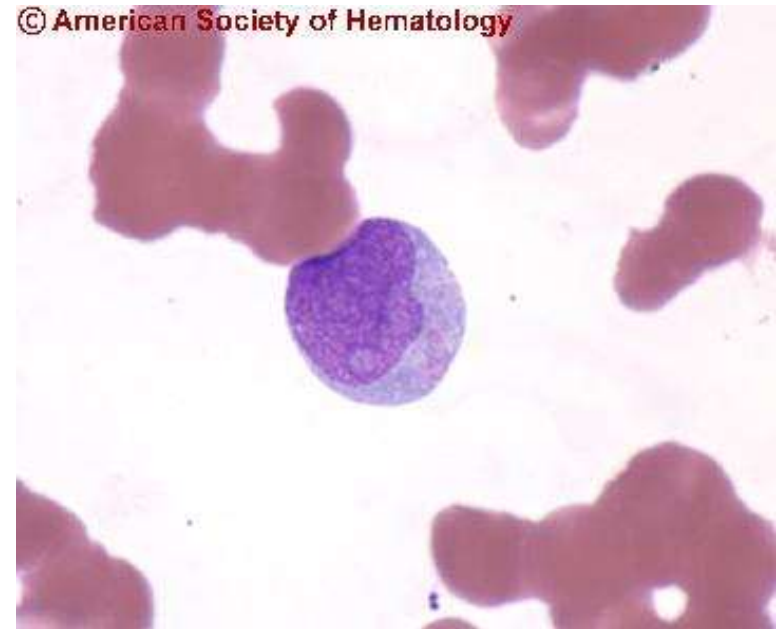
Προσοχή
έκφραση του δείκτη **CD2**
σε κύτταρα της μυελικής
= πιθανόν ΟΠΛnar όπου
μπορεί να εκφράζεται
και CD34dim



Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

+ (8;21)(q22;q22), AML1/ETO^{pos}

- FAB: AML-M2 ?
- Παράδειγμα Core Binding Factor (CBF) λευχαιμίας.
- Καλή πρόγνωση
- Ευαισθησία σε πολλαπλούς διαδοχικούς κύκλους high-dose cytosine arabinoside.



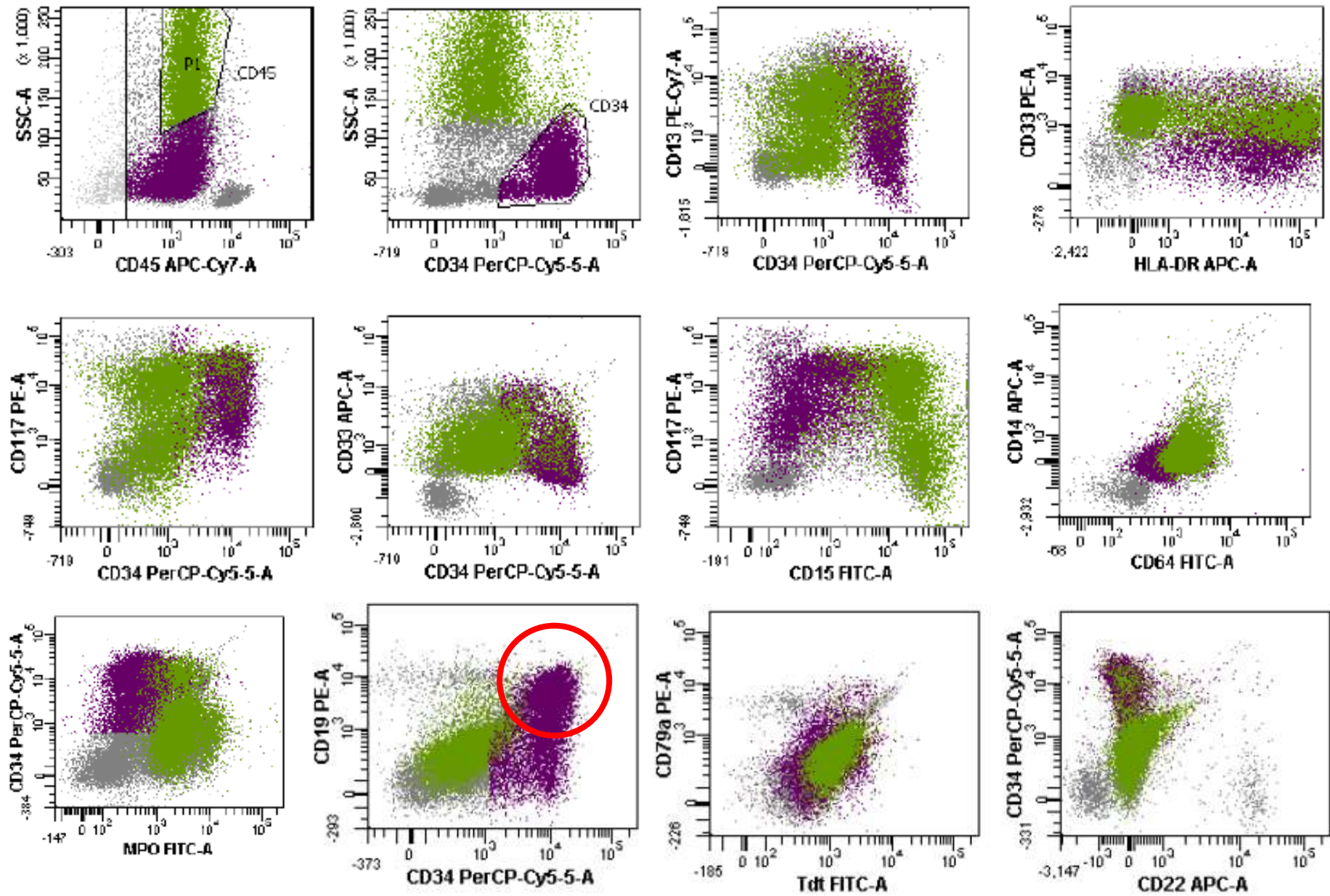
- Ανοσοφαινότυπος :
 - ✓ CD34+ CD13+ CD33-/dim+ MPO+ HLA-DR+
 - ✓ CD11a-CD18-
 - ✓ CD19+ ή/ και CD56+

✓ Η έκφραση του CD19 μπορεί να είναι ασθενής ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται FITC.

✓ Η ανεύρεση CD34+ CD13+ CD33- CD19+ επιβάλλει την ανίχνευση MPO και cyCD22.

ΟΜΛ με t (8;21)(q22;q22), AML1/ETO^{pos}

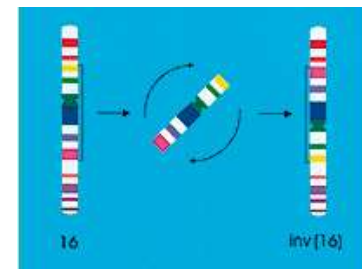
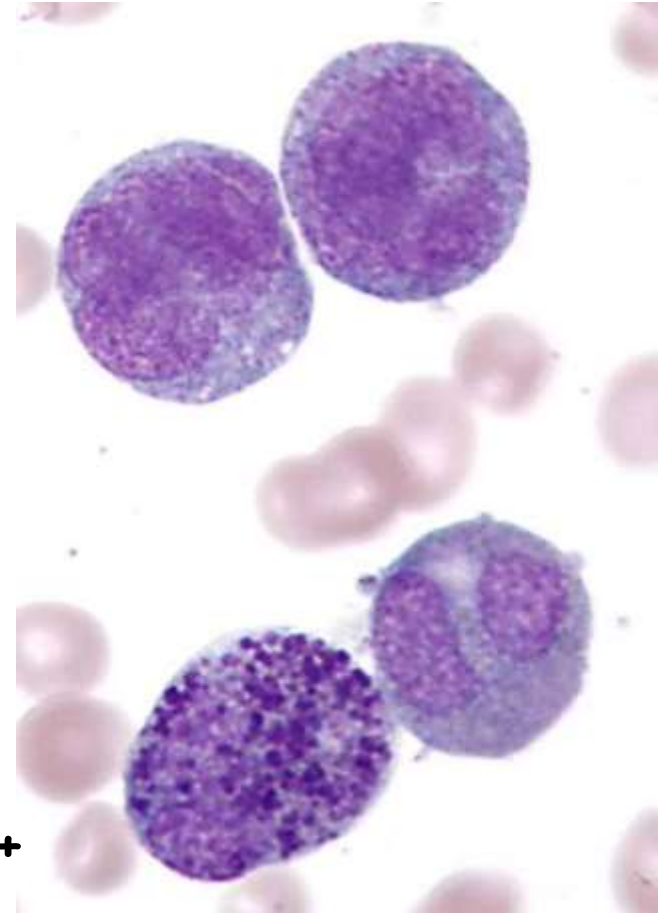
ΟΜΛ με ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά M2 και συνέκφραση **CD19** (CD79a-CD22-)



Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

Inv(16)(p13;q22) / t(16;16)(p13;q22), CBFβ/ΜΥΗ11

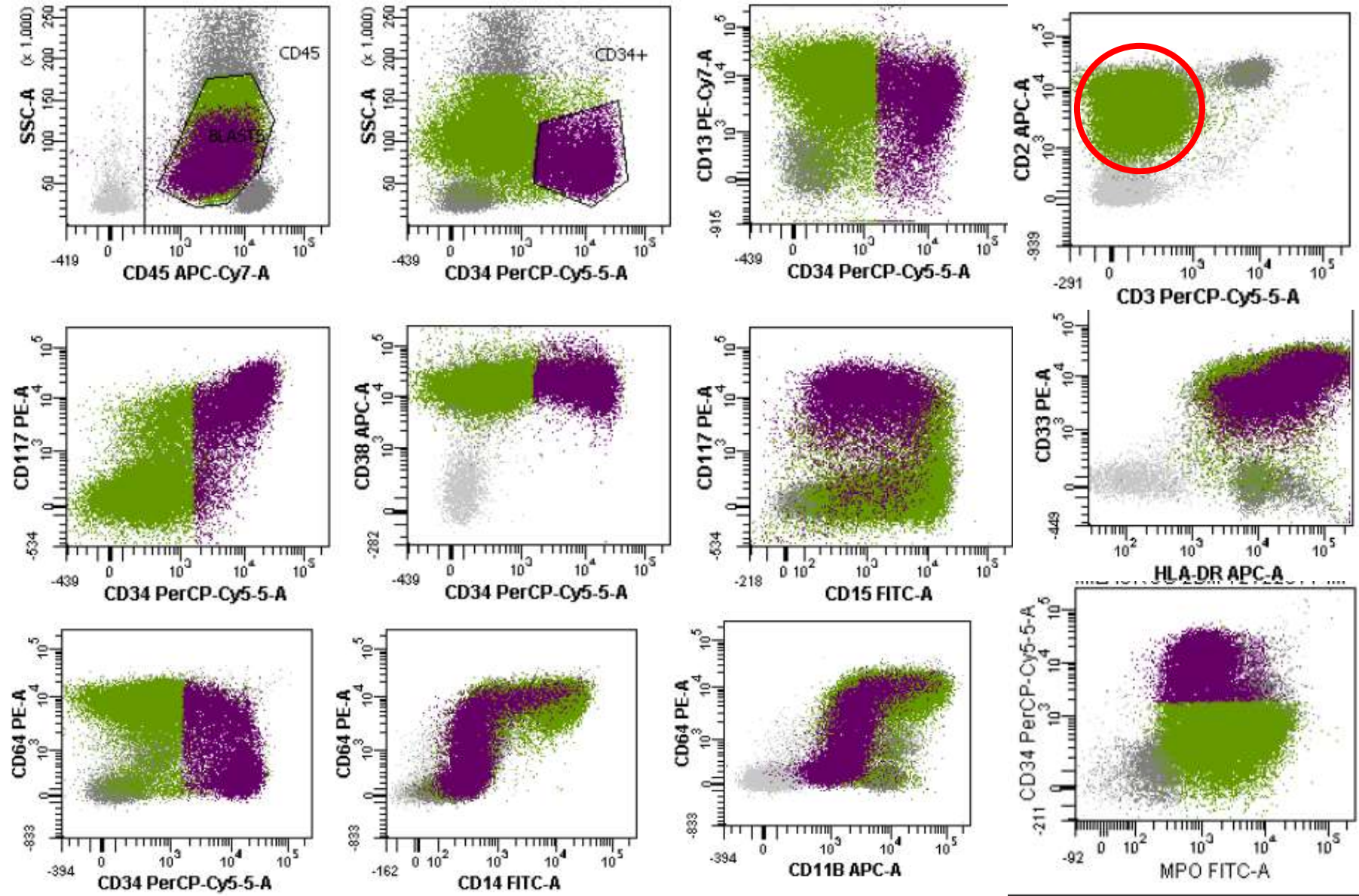
- FAB: OML M4eo
- Core Binding Factor (CBF) λευχαιμία.
- Οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία με ανώμαλα ηωσινόφιλα.
- Καλή πρόγνωση
- Ανοσοφαινότυπος:
 - ✓ CD34p+ CD117p+ CD13++ CD33++
MPO++ HLA-DR+
 - ✓ CD15p+ CD11bp+ CD14p+ CD64+ CD4p+
 - ✓ CD2+/-



Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

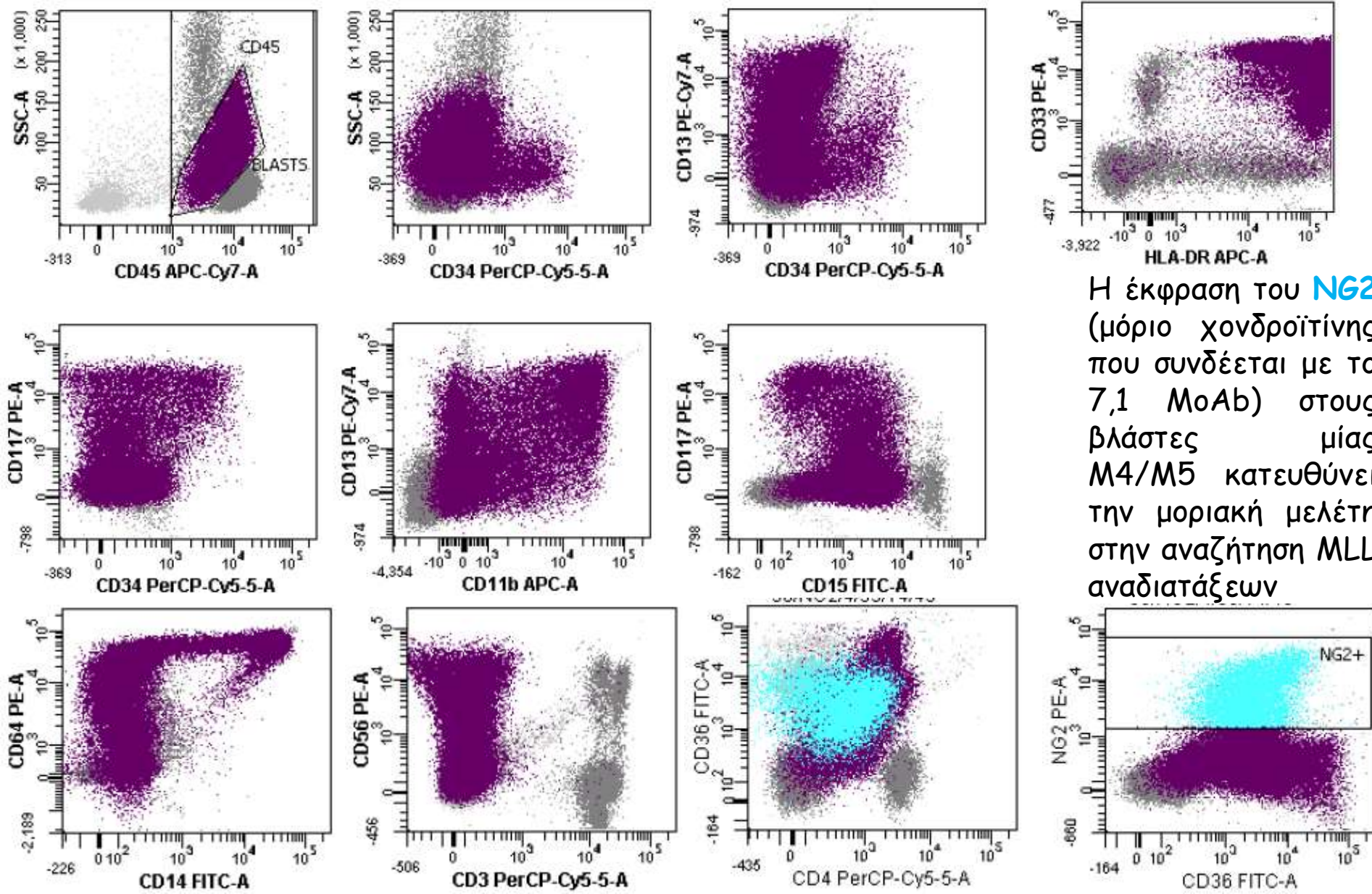
Inv(16)(p13;q22) / t(16;16)(p13;q22), CBFβ/ΜΥΗ11

ΟΜΛ με ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά Μ4 και συνέκφραση **CD2** (cytCD3-)



Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία t(9;11)(p22;q23), MLLT3-MLL

ΟΜΛ με ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά M4/M5 και συνέκφραση NG2



Η έκφραση του NG2 (μόριο χονδροϊτίνης που συνδέεται με το 7,1 MoAb) στους βλάστες μίας M4/M5 κατευθύνει την μοριακή μελέτη στην αναζήτηση MLL αναδιατάξεων

Πολυάριθμες μελέτες προσπαθούν να συσχετίσουν ανοσοφαινοτυπικά προφίλ με συγκεκριμένες γενετικές διαταραχές

Acute Leukemia Haematologica 2003; 88:637-645 *research paper* **h**

Immunophenotypic findings in acute myeloid leukemia with FLT3 internal tandem duplication

Luz Muñoz, Ana Aventín, Neus Villamor, Jordi Juncà, Gemma Acebedo, Alicia Domingo, María Rozman, J Pio Torres, Mar Tormo, Josep F. Nomdedéu

HLA-DR- CD34- (CD56+CD123+CD133-)
+ Μορφολογία + αρνητικός καρυότυπος → FLT3-ITD+

Leukemia Research 35 (2011) 163–168

Immunophenotype of acute myeloid leukemia with NPM mutations: Prognostic impact of the leukemic compartment size

J. Nomdedeu^{a,*}, E. Bussaglia^a, N. Villamor^b, C. Martinez^a, J. Esteve^b, M. Tormo^c, C. Estivill^a, M.P. Queipo^d, R. Guardia^e, M. Carricondo^a, M. Hoyos^a, A. Llorente^f, J. Juncà^g, M. Gallart^h, A. Domingoⁱ, J. Bargay^j, M. Mascaró^j, J.M. Moraleda^k, L. Florensa^l, J.M. Ribera^g, D. Gallardo^e, S. Brunet^a, A. Aventin^a, J. Sierra^a, on behalf of the Spanish CETLAM

CD34- CD117+ CD13+CD15+CD33++
CD123+ HLA-DR+/- → NPM1+

Η ΜΡΟ στην διάγνωση και ταξινόμηση της ΟΛ

MPO +

- M1
- M2
- APL bright
- M4
- M5b dim

MPAL

(το μυελικό στοιχείο)

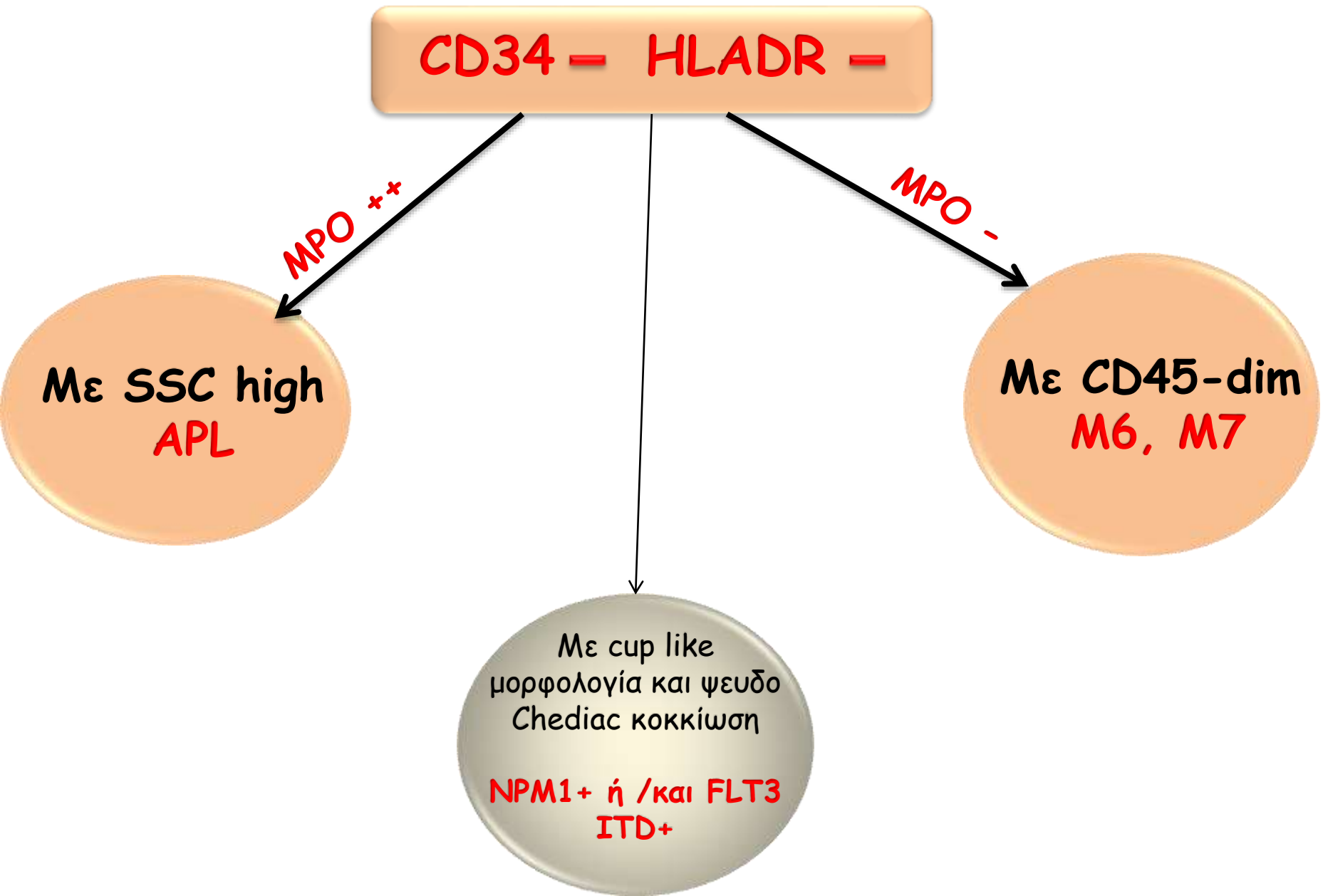
MPO -

cytCD3-cytCD79a-cytCD22-CD19-

- M0
- M5a (μονοβλάστες -
προμονοκύτταρα dim)
- M6 (μυελοβλάστες +)
- M7
- Basophilic Leukemia
- Mast cell Leukemia

**AUL
BDCN**

Ανοσοφαινοτυπικό προφίλ που κατευθύνει την ταξινόμηση της ΟΜΛ

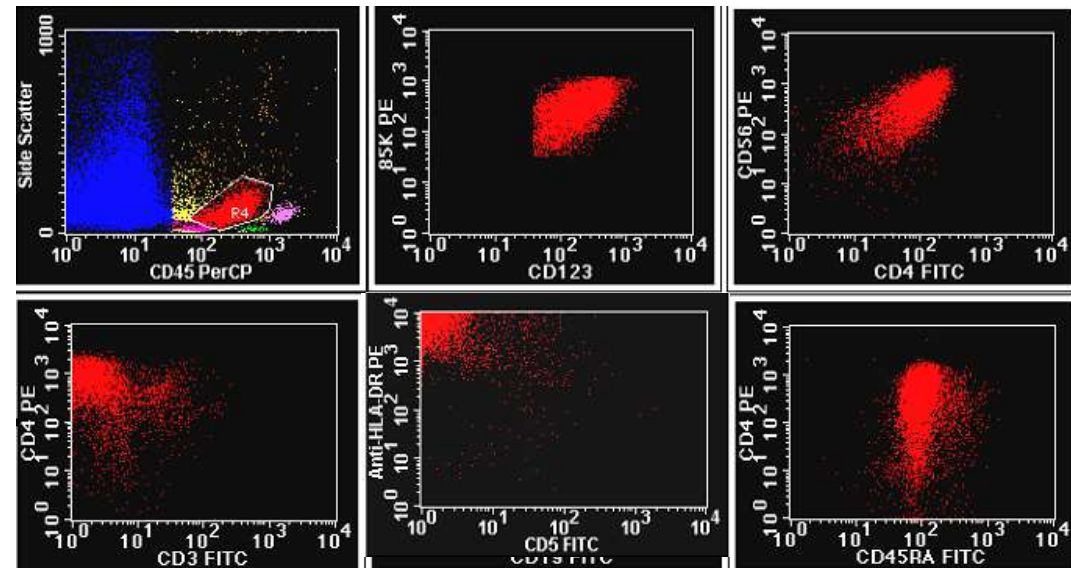
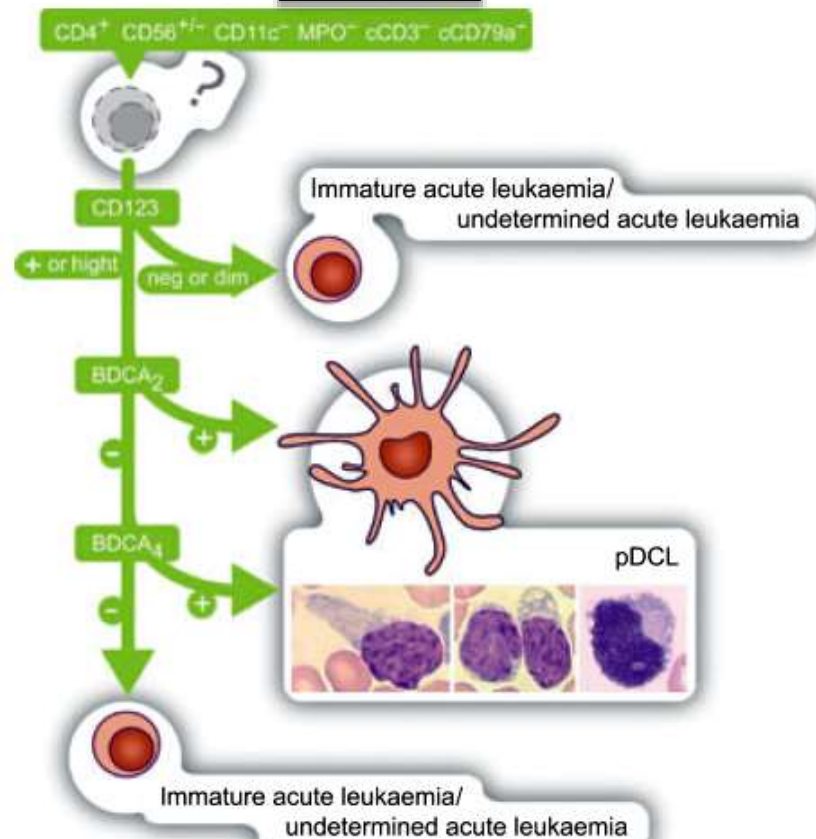


ΝΕΟΠΛΑΣΜΑ ΑΠΟ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΟΕΙΔΗ ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm, BPDCN)

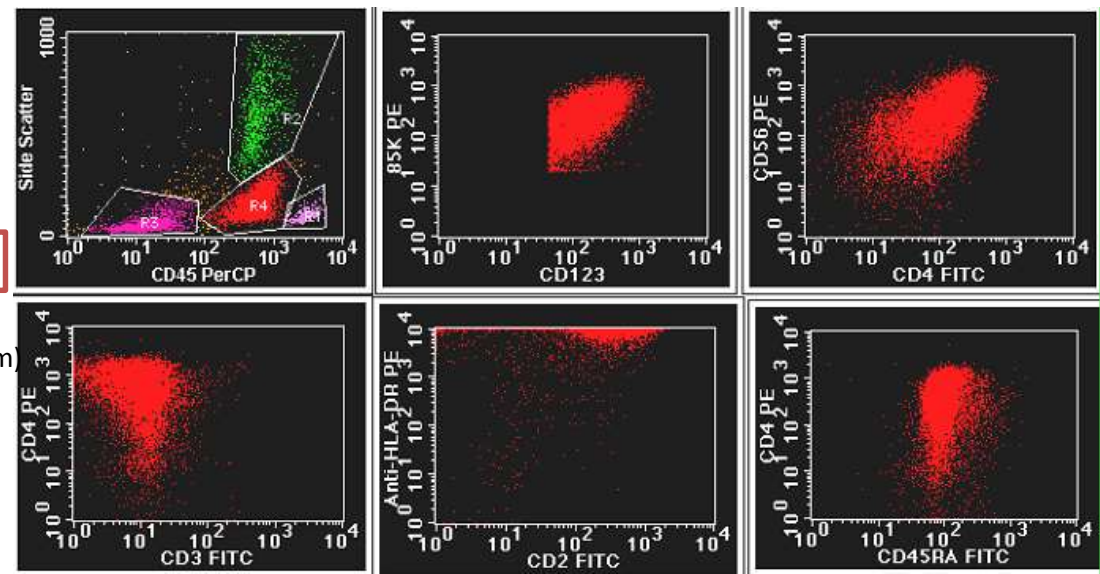
- Παλαιότερα ήταν γνωστό σαν CD4+/CD56+ αιματοδερμικό νεόπλασμα αλλά στην WHO,2008 ενσωματώθηκε στα νεοπλάσματα μυελικής προέλευσης.
 - ✓ Σπάνιο και επιθετικό νεόπλασμα που εμφανίζεται αρχικά με εστίες στο δέρμα και στην συνέχεια διηθεί το περιφερικό αίμα και τον μυελό.
 - ✓ Οι βλάστες δεν εκφράζουν δείκτες ειδικούς κάποιας σειράς (**lineage-** : **MPO-**, **NSE-**, **cyCD3-**, **cyCD22-**) ούτε τους δείκτες αωρότητας CD34 και CD117.
 - ✓ εκφράζουν τους δείκτες **CD4+ CD56+ CD123++ HLA-DR++ BDCA-2 (CD303+) CD43+ TCL1+ CLA+ CD45RA+**
 - ✓ συχνά συνεκφράζουν CD7 και CD33 και στο 30% των περιπτώσεων TdT ενώ CD68 εκφράζεται στο 50% των περιπτώσεων.
 - ✓ σπάνια το **CD56** είναι αρνητικό αλλά αυτό δεν αποκλείει την διάγνωση αν εκφράζονται το **CD4+ CD123++TCL1+** και είναι **lineage-** ενώ αν δεν πληρούνται τα κριτήρια θα πρέπει να ταξινομείται στις λευχαιμίες αδιευκρίνιστης σειράς.
 - ✓ σπάνια η διήθηση μυελού προηγείται της εμφάνισης των δερματικών αλλοιώσεων.

BPDC

ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ ΒΛΑΒΗ



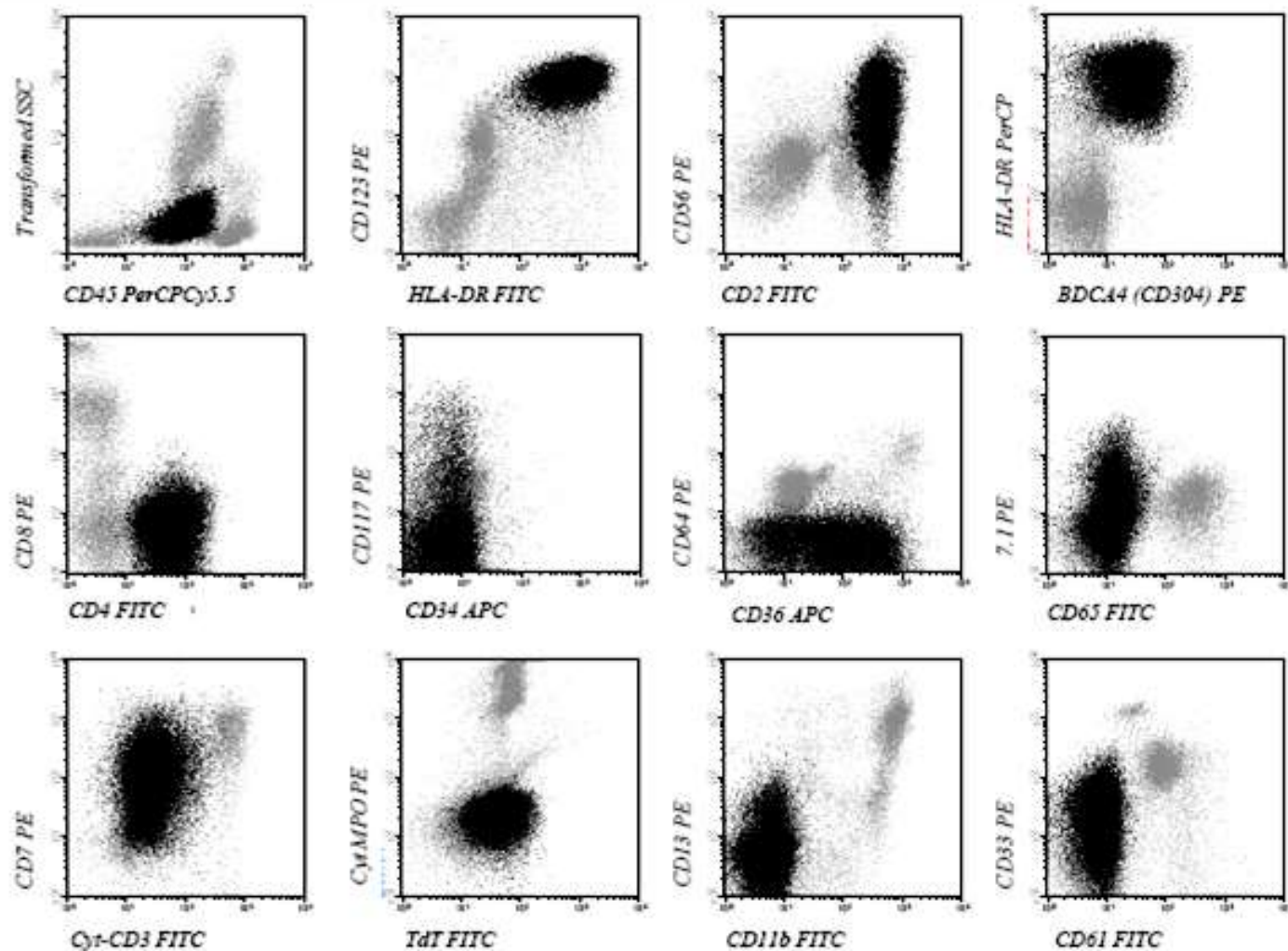
ΜΥΕΛΟΣ



Scoring System

Markers	Present	Absent
Profile: CD4+CD56+/-CD11c- MPO- cCD79a-cCD3-	1	BDCN excluded
CD123+/high	1	0 (CD123-/dim)
BDCA-2	2	0
BDCA-4	1	0

Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (WHO 2008): Immunophenotypic features



ΟΞΕΙΕΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ ΑΔΙΕΥΚΡΙΝΙΣΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ (Acute leukemias of Ambiguous lineage)

- Σπάνιες λευχαιμίες που περιλαμβάνουν
 - ✓ **Οξεία αδιαφοροποίητη λευχαιμία (Acute undifferentiated leukemia, AUL)**
τα λευχαιμικά κύτταρα δεν εκφράζουν κανένα ειδικό δείκτη διαφοροποίησης προς συγκεκριμένη σειρά.
(CD34+ HLA-DR+ CD38+/- **lineage -**)
 - ✓ **Οξεία λευχαιμία με μικτό φαινότυπο (Mixed phenotype acute leukemia, MPAL):** τα λευχαιμικά κύτταρα εκφράζουν δείκτες περισσότερων της μίας σειράς (μυελική+B-λεμφική, μυελική+T-λεμφική, μυελική+B-λεμφική+T-λεμφική) και μπορεί να είναι
 - **Δικλωνικές :** δύο οι περισσότεροι βλαστικοί πληθυσμοί από διαφορετικές σειρές
 - ή
 - **Διφαινοτυπικές :** ένας βλαστικός πληθυσμός που εκφράζει δείκτες από διαφορετικές σειρές στο ίδιο κύτταρο

ΟΞΕΙΕΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ ΜΕ ΜΙΚΤΟ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ - ΜΡΑΛ

Acute undifferentiated leukemia

Mixed phenotype acute leukemia with t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*

Mixed phenotype acute leukemia with t(v;11q23); *MLL* rearranged

Mixed phenotype acute leukemia, B-myeloid, NOS

Mixed phenotype acute leukemia, T-myeloid, NOS

Provisional entity: natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma

- **Οξεία Λευχαιμία με μικτό φαινότυπο και t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1**

✓ Στις περισσότερες περιπτώσεις οι βλάστες πληρούν τα κριτήρια για την μυελική και την Β λεμφική σειρά και σπανιότερα για την μυελική και Τ λεμφική σειρά.

- **Οξεία Λευχαιμία με μικτό φαινότυπο και t(v;11q23); MLL rearranged**

✓ Στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρείται διμορφικός βλαστικός πληθυσμός με βλάστες που μοιάζουν με μονοβλάστες και βλάστες που μοιάζουν με λεμφοβλάστες. Μπορεί όμως να μοιάζουν και με αδιαφοροποίητους βλάστες.

✓ οι λεμφοβλάστες είναι CD19+ CD10- CD22-/dim CD79a -/dim CD15+ ενώ οι μονοβλάστες εκφράζουν δείκτες της μονοκυτταρικής σειράς CD14, CD64, CD11b, lysozyme, CD36.

✓ η χρησιμοποίηση του 7,1 MoAb που συνδέεται με το NG2 ομόλογο που εκφράζεται στους βλάστες των ΟΜΛ με 11q23 βοηθάει στην ταυτοποίηση της σπάνιας αυτής λευχαιμίας.

ΟΞΕΙΕΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ ΜΕ ΜΙΚΤΟ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ - ΜΡΑΛ

Στην WHO, 2008 αποτελούν ξεχωριστή ομάδα νεοπλασμάτων μυελικής προέλευσης που περιλαμβάνει τις παλαιότερα ταξινομούμενες σύμφωνα με το EGIL scoring system σαν Διφαινοτυπικές (BAL) και Δικλωνικές Λευχαιμίες

EGIL-Revised scoring system 1998

points	B-lineage	T-lineage	Myeloid lineage
2	CD79a cyt IgM cyt CD22	CD3 (memb/cyt) anti-TCR α/β anti-TCR γ/δ	anti-MPO
1	CD19 CD10 CD20	CD2 CD5 CD8 CD10	CD117 (c-kit) CD13 CD33 CD65
0.5	TdT CD24	TdT CD7 CD1a	CD14 CD15 CD64

BAL is defined when the score is **over 2** for both the myeloid and the lymphoid lineage

ΟΞΕΙΕΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ ΜΕ ΜΙΚΤΟ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ - ΜΡΑΛ

Τα κριτήρια που απαιτείται να πληρούνται για να χαρακτηριστεί μια ΟΛ σαν Οξεία Λευχαιμία με Μικτό Φαινότυπο (ΜΡΑΛ) είναι πολύ πιο αυστηρά και βασίζονται κυρίως στον ανοσοφαινότυπο

Table 9. Requirements for assigning more than one lineage to a single blast population in mixed phenotype acute leukemia (MPAL)

Myeloid lineage

Myeloperoxidase (flow cytometry, immunohistochemistry, or cytochemistry)

or

Monocytic differentiation (at least 2 of the following: nonspecific esterase, CD11c, CD14, CD64, lysozyme)

T lineage

Cytoplasmic CD3 (flow cytometry with antibodies to CD3 epsilon chain; immunohistochemistry using polyclonal anti-CD3 antibody may detect CD3 zeta chain, which is not T cell–specific)

or

Surface CD3 (rare in mixed phenotype acute leukemia)

B lineage (multiple antigens required)

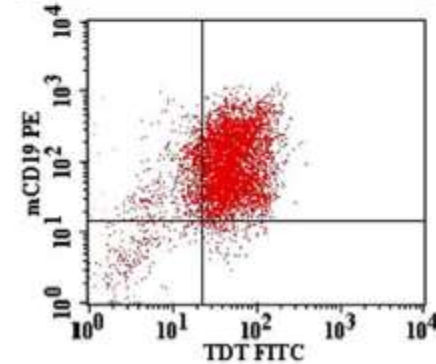
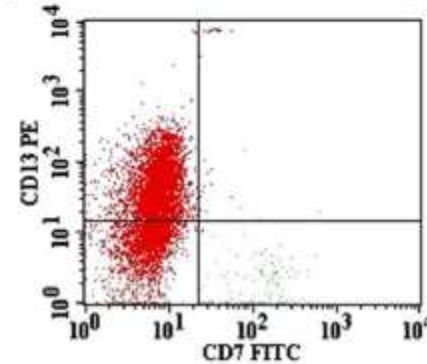
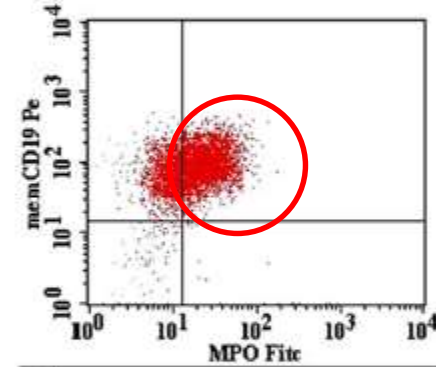
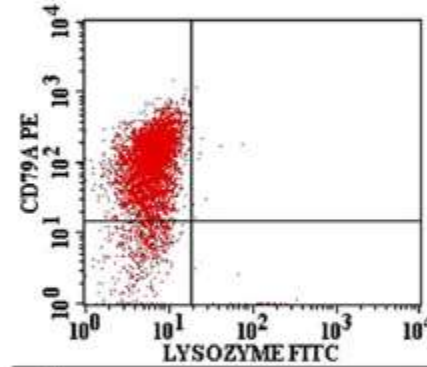
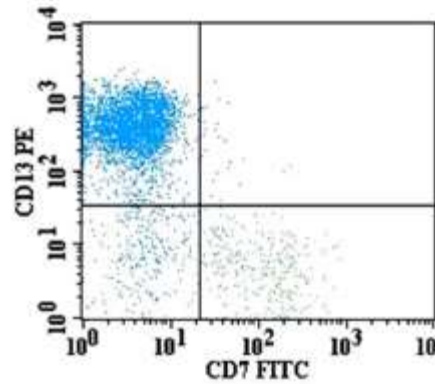
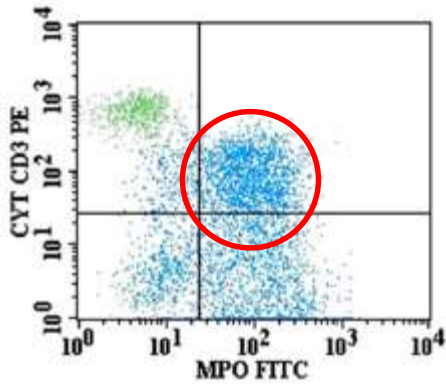
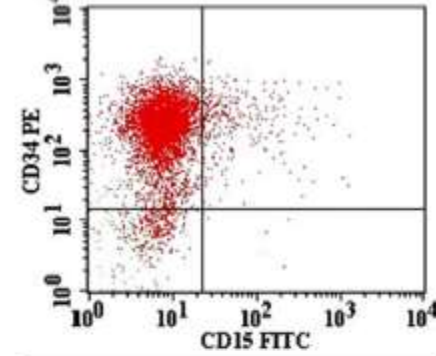
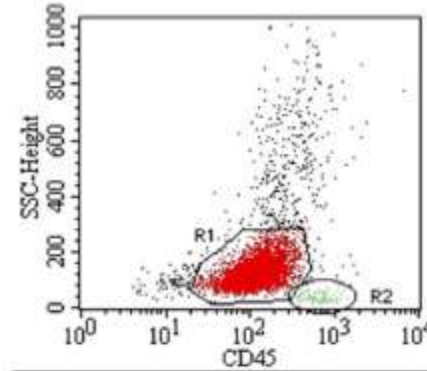
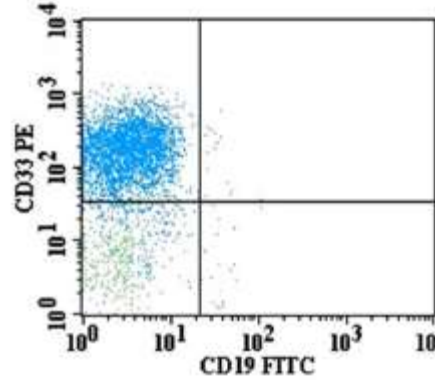
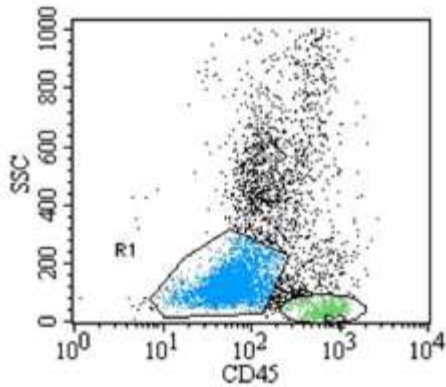
Strong CD19 with at least 1 of the following strongly expressed: CD79a, cytoplasmic CD22, CD10

or

Weak CD19 with at least 2 of the following strongly expressed: CD79a, cytoplasmic CD22, CD10

ΟΞΕΙΕΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ ΜΕ ΜΙΚΤΟ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ - ΜΡΑΛ

Η πολυχρωματική ΚΡ **απαραίτητη** για την διάγνωση των ΜΡΑΛ
Μυελική + T **Μυελική + B**

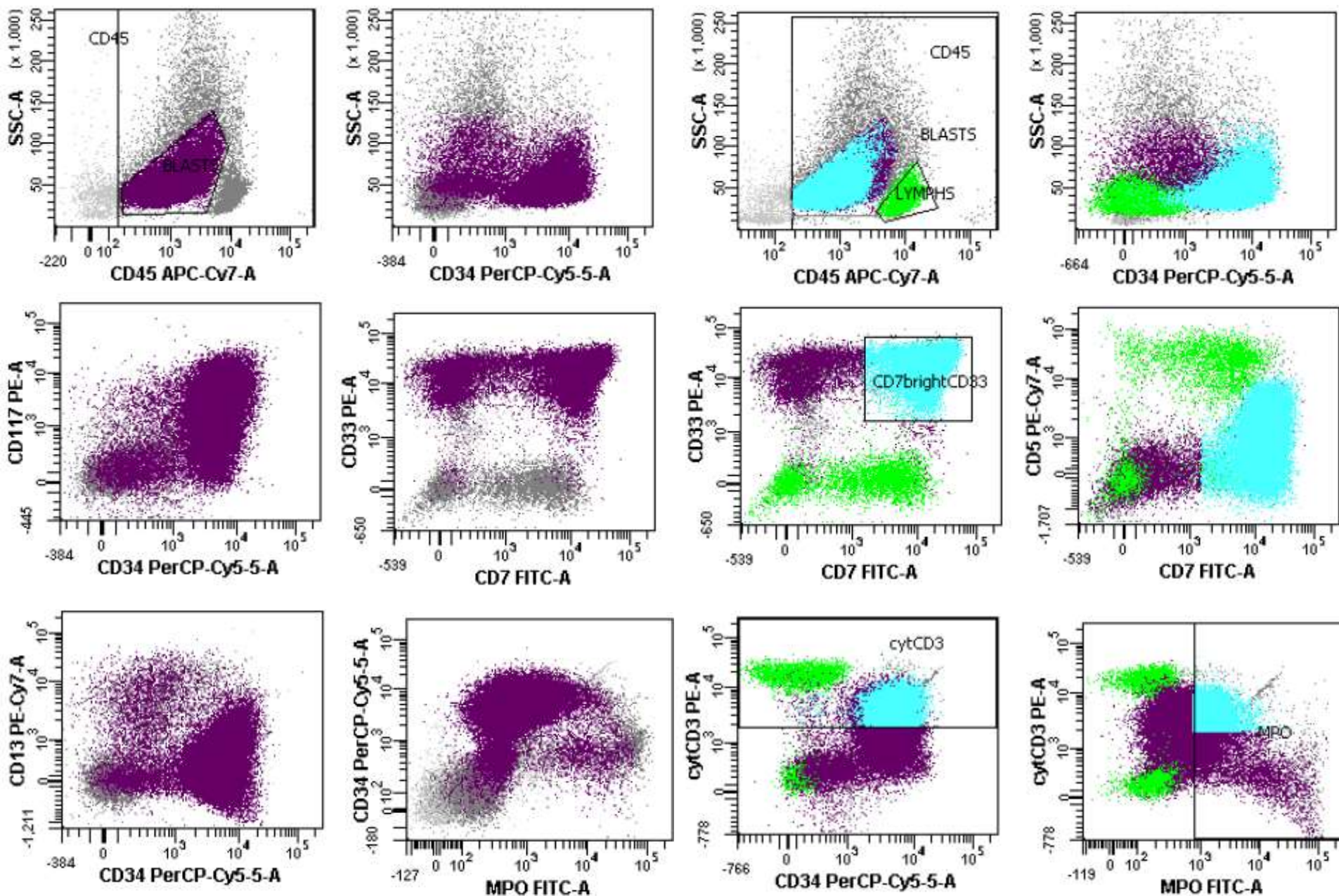


- ❖ Η ανίχνευση του cytCD3 πρέπει να γίνεται με MoAbs έναντι της ε αλυσίδας του μορίου CD3 συνδεδεμένα με ένα έντονο φθοριόχρωμα (PE)
- ❖ Θετικό όταν εκφράζεται με την ίδια ή λίγο ασθενέστερη ένταση που το εκφράζουν τα φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα

Οξεία Λευχαιμία με Μικτό Φαινότυπο (Μυελική + Τ λεμφική) - MPAL (Μ+Τ)

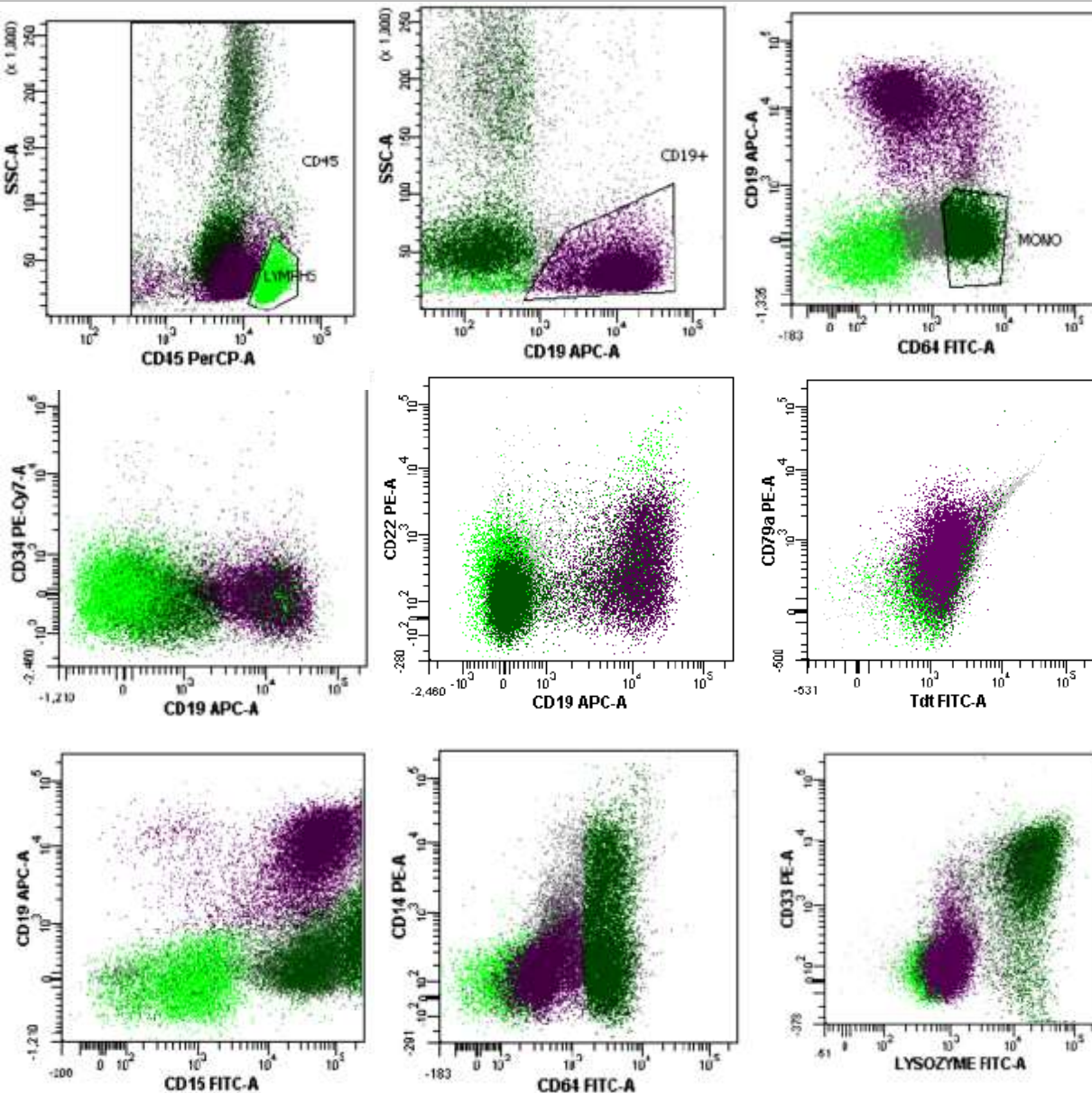
Μυελική σειρά : MPO+

Λεμφική σειρά : cytCD3+



Οξεία Λευχαιμία με Μικτό Φαινότυπο (Μονοκυτταρική + Β λεμφική)

MPAL (M+B) με t(v;11q23); MLL rearranged

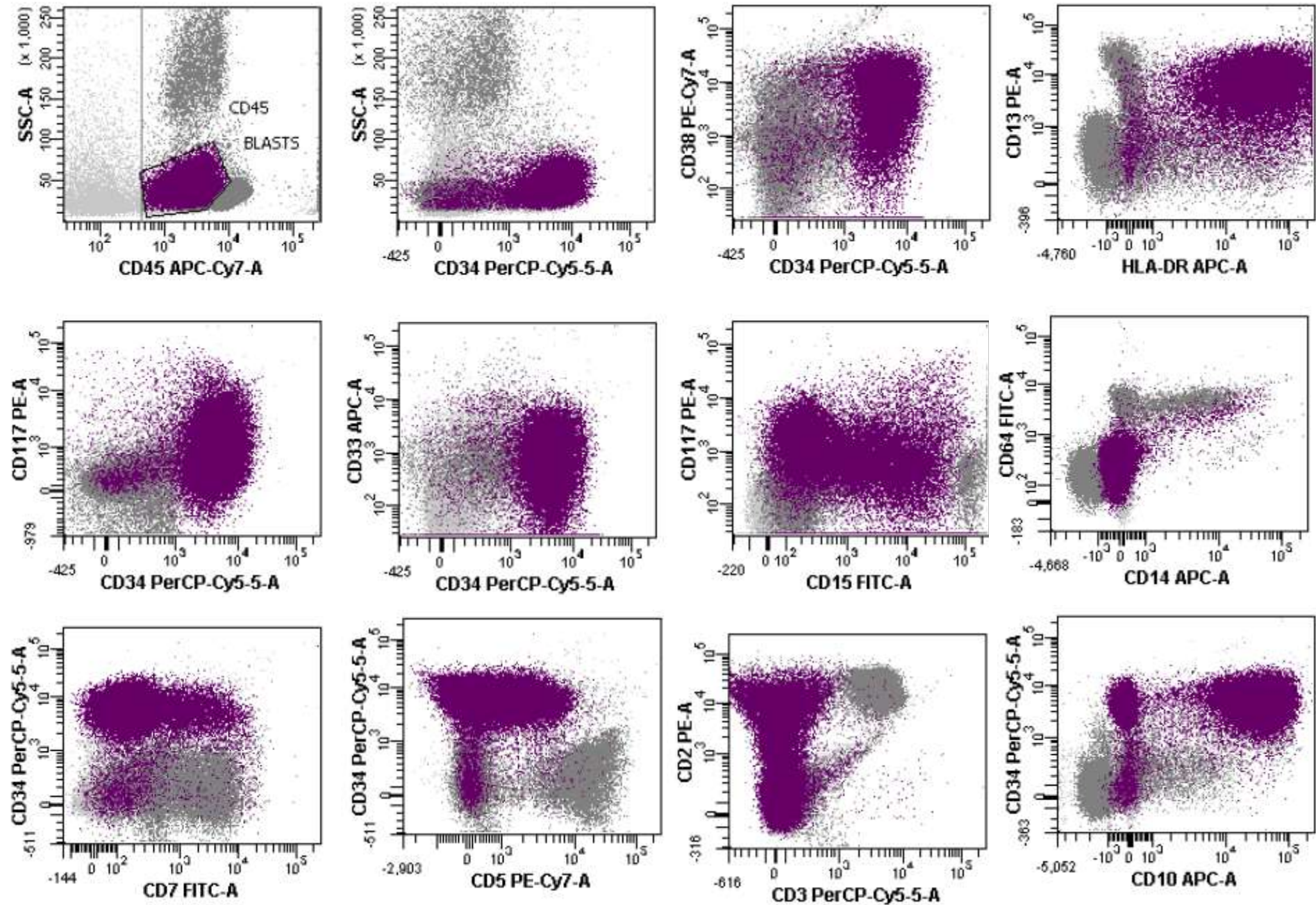


1: CD19+CD15+CD34-
CD22-CD79a-TdT-

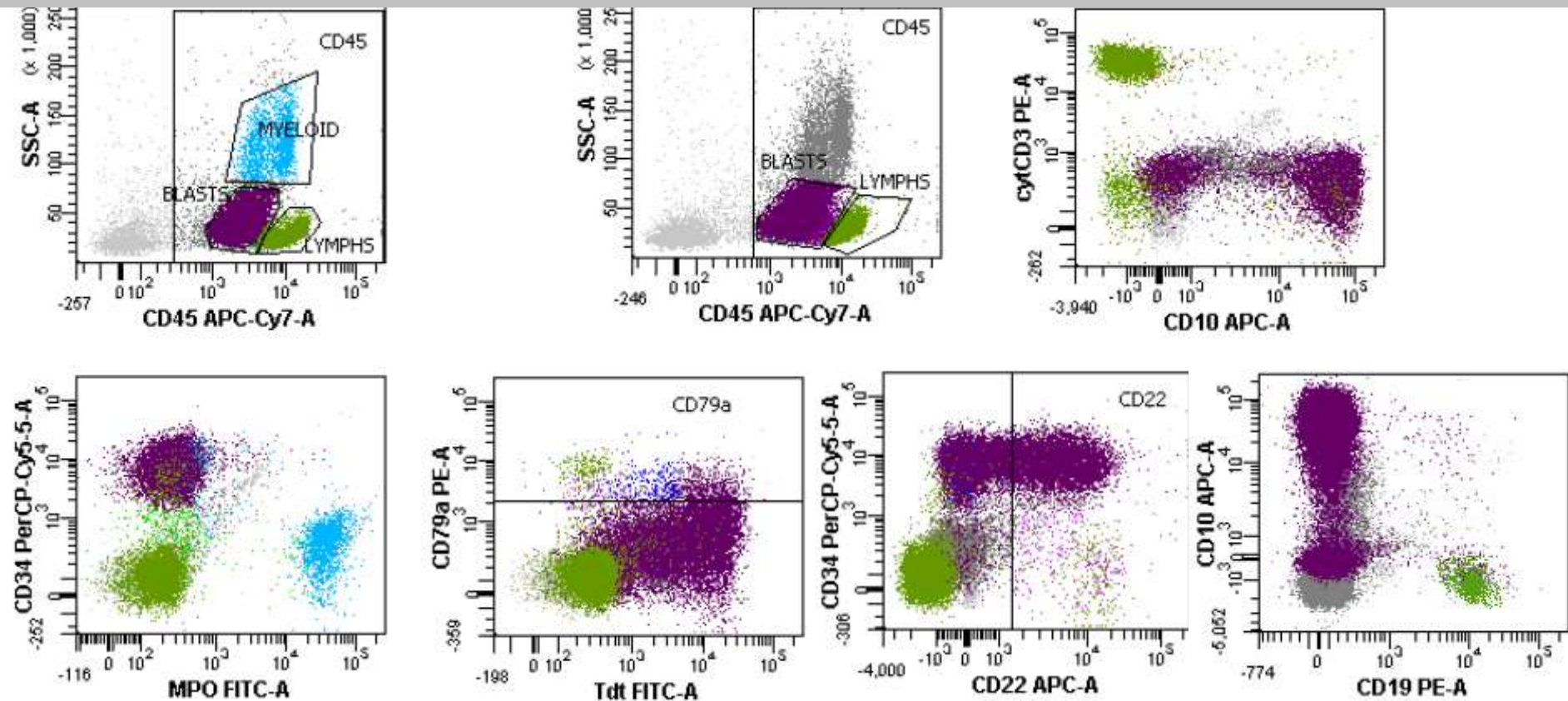
2: CD64+CD14p+ lysozyme+
CD15+CD34-

■ Η αναγνώριση του χαρακτηριστικού ανοσοφαινοτυπικού προφίλ ή /και η αναζήτηση της έκφρασης του δείκτη **NG2** κατευθύνει την μοριακή μελέτη για την ανίχνευση **t(v;11q23);MLL**

Ας προσπαθήσουμε να εφαρμόσουμε τα κριτήρια της WHO, 2008



ΟΜΛ με έκφραση Β και Τ δεικτών ?
 ΜΡΑΛ (Μυελική+Β)? ΜΡΑΛ (Μυελική+Τ) ?



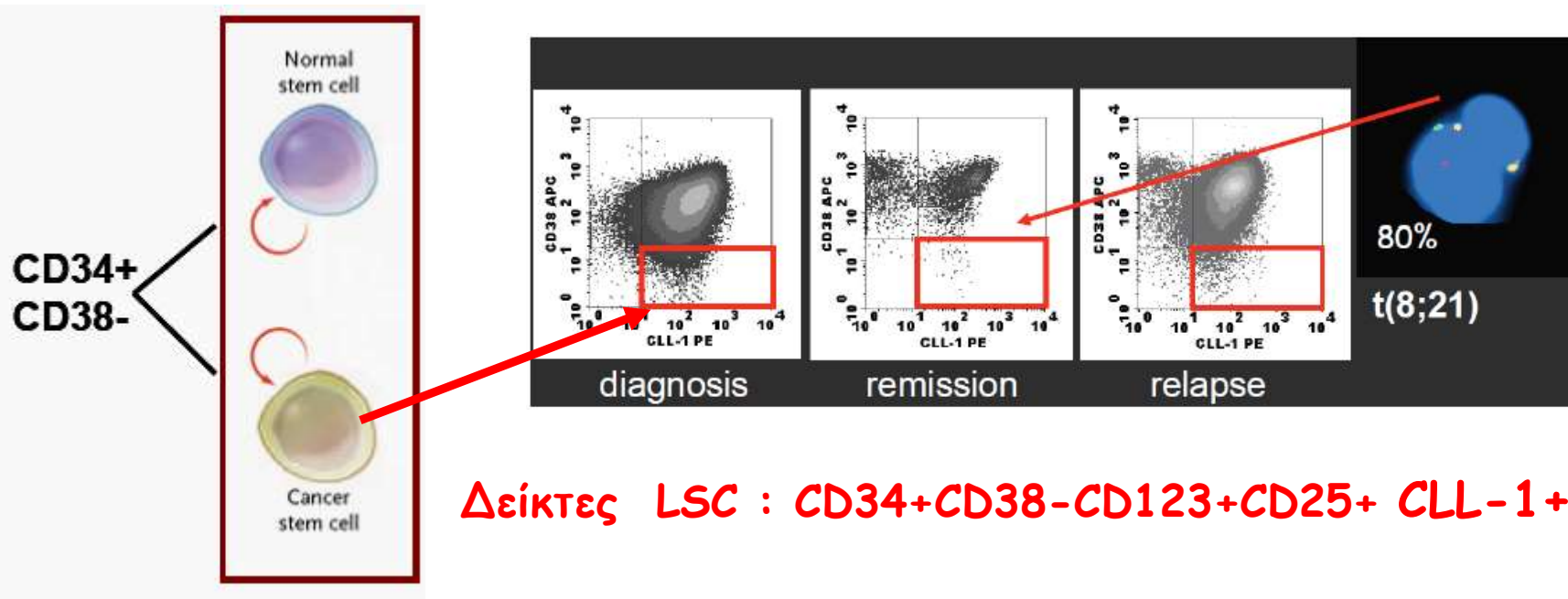
Πως θα χαρακτηρίζατε αυτή την λευχαιμία εφαρμόζοντας τα κριτήρια της WHO, 2008 και πώς εφαρμόζοντας το EGIL scoring system ?

Έκθεση αποτελέσματος σε μια ΟΛ

- Ονοματεπώνυμο, ηλικία, φύλο του ασθενούς, ημερομηνία παραλαβής του δείγματος
- Είδος δείγματος (μυελός, περιφερικό αίμα κλπ), χρονική στιγμή (διάγνωση, παρακολούθηση)
- Πληροφορίες από το ιστορικό, την κλινική εικόνα, την μορφολογία, τις υπόλοιπες εργαστηριακές εξετάσεις (αν έχουν δοθεί)
- Πληροφορίες για την ακεραιότητα, την σύσταση και την βιωσιμότητα των κυττάρων του δείγματος
- Ποσοστό % των βλαστών στο σύνολο των εμπυρήνων κυττάρων του δείγματος
- Αναφορά των δεικτών που εκφράζει ο παθολογικός πληθυσμός
 - ✓ Αναφέρονται πρώτα οι δείκτες που χαρακτηρίζουν την σειρά και το στάδιο διαφοροποίησης και ωρίμανσης του βλαστικού πληθυσμού, οι δείκτες αωρότητας (αν εκφράζονται) και τέλος αν εκφράζονται δείκτες από άλλη σειρά ή δείκτες που σχετίζονται με συγκεκριμένη γενετική διαταραχή ή με την πρόγνωση.
 - ✓ Θα πρέπει να αναφέρεται η ένταση της έκφρασης των δεικτών (dim, bright) καθώς και αν εκφράζονται στο σύνολο ή σε ένα μέρος των βλαστών (partial)
- Στο συμπέρασμα πρέπει να αναγράφεται πως χαρακτηρίζεται ανοσοφαινοτυπικά η ΟΛ, το στάδιο διαφοροποίησης κατά WHO ή/και κατά FAB (πχ ΟΜΛ χωρίς ωρίμανση/M1), πληροφορίες για την κατεύθυνση της μοριακής μελέτης και τα LAIP με τα οποία θα αναζητηθεί η MRD κατά την παρακολούθηση.

Leukemia Stem Cells (LSC) στην ΟΜΛ

Αρκετές μελέτες τα τελευταία χρόνια αποδεικνύουν ότι σχεδόν σε κάθε ΟΜΛ μέσα στον βλαστικό πληθυσμό υπάρχει, έστω και σε πολύ μικρό αριθμό, ένας υποπληθυσμός **LSC (CD34+CD38-lin-)** στον οποίο φαίνεται να οφείλεται η αντοχή στην χημειοθεραπεία και ως εκ τούτου η υποτροπή



Δείκτες LSC : CD34+CD38-CD123+CD25+ CLL-1+...?

Η αναγνώριση και μέτρηση των LSC στον ανοσοφαινότυπο της διάγνωσης μπορεί να συμβάλλει

- ✓ στην πρόγνωση (ασθενείς με LSC < 3,5% των CD34+ έχουν καλύτερο RFS)
- ✓ στην ανίχνευση MRD κατά την παρακολούθηση
- ✓ στην εφαρμογή LSC στοχευμένης θεραπείας

PANEL ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΟΜΛ

- Screening panel αρχικά
- Ευρύ panel στην συνέχεια
- Δείκτες για αναγνώριση χαρακτηριστικών ανοσοφαινοτυπικών προφίλ
 - ✓ λήψη γρήγορων θεραπευτικών αποφάσεων
 - ✓ καθοδήγηση μοριακής μελέτης
 - ✓ πρόγνωση
 - ✓ επιλογή κατάλληλης θεραπευτικής στρατηγικής
- Δείκτες για την αναγνώριση, επιλογή και καταγραφή των κατάλληλων LAIP για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και την ανίχνευση MRD
- Εκτίμηση της έκφρασης δεικτών που αποτελούν θεραπευτικούς στόχους (targeted therapy).

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΟΜΛ/ΜΡΑΛ

- Προσοχή στον υπολογισμό % βλαστών λόγω της ετερογένειας του βλαστικού πληθυσμού
- Οι βλάστες της ΟΜΛ μπορεί να μην εκφράζουν δείκτες αωρότητας (CD34-CD117-HLADR-)
- Η έκφραση T δεικτών σε έναν βλαστικό πληθυσμό MPO+ επιβάλλει την ανίχνευση cytCD3 για να αποφασιστεί αν πρόκειται για ΟΜΛ με έκτοπη έκφραση T δεικτών ή ΜΡΑΛ (Μυελική+T)
- Η έκφραση B δεικτών σε έναν βλαστικό πληθυσμό MPO+ επιβάλλει την ανίχνευση cytCD79α και cytCD22 για να αποφασιστεί αν πρόκειται για ΟΜΛ με έκτοπη έκφραση B δεικτών ή ΜΡΑΛ (Μυελική+B)
- Ένας βλαστικός πληθυσμός MPO- μπορεί να ανήκει στην μυελική σειρά αν δεν εκφράζει ειδικούς δείκτες της T ή B σειράς
- Ένας βλαστικός πληθυσμός MPO- μονοκυτταρικοί δείκτες-cytCD3-CD19-cytCD22-cytCD79α- επιβάλλει την ανίχνευση δεικτών της ερυθράς και μεγακαρυοβλαστικής σειράς, δεικτών που χαρακτηρίζουν τα βασεόφιλα και μαστοκύτταρα καθώς και του ανοσοφαινοτυπικού προφίλ που χαρακτηρίζει το BPRCN προκειμένου να χαρακτηριστεί τελικά AUL