

ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΗ Β-ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

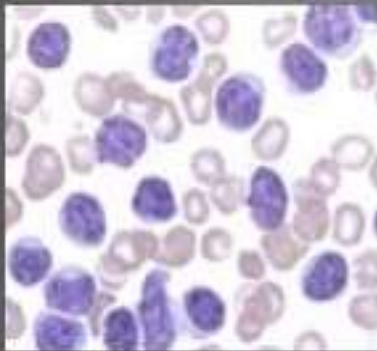
ΛΕΥΚΟΘΕΑ Σ. ΝΤΟΒΑ

Βιοχημικός, Msc, PhD

Επιστημονικός συνεργάτης Μονάδας Μοριακής Βιολογίας-
Αιματολογικό Εργαστήριο, Πανεπιστημιακό Γενικό
Νοσοκομείο Ιωαννίνων

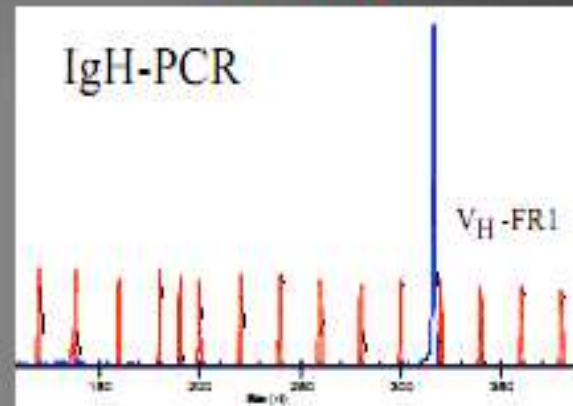
Η Β-ΧΛΛ είναι μια **μονοκλωνική** διαταραχή που χαρακτηρίζεται από προοδευτική **συσσώρευση** μη **λειτουργικών λεμφοκυττάρων**

Lymphocytosis > 5000 lymfo's/ μ l

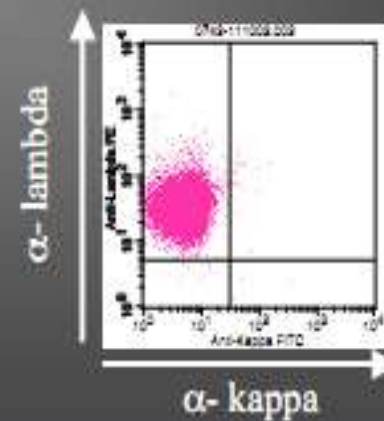
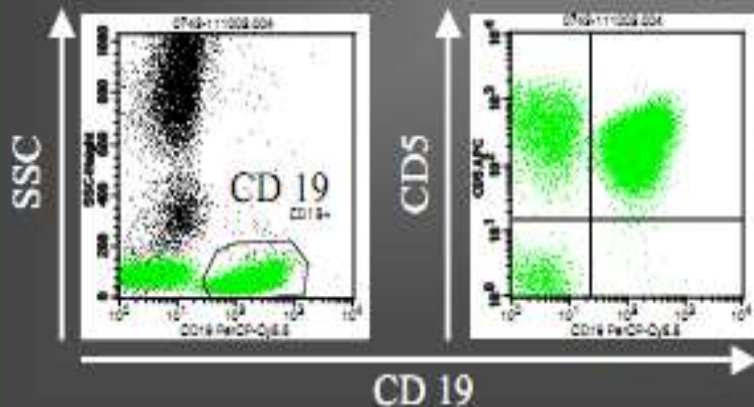


Clonality

IgH-PCR



FLOW: Aberrant expression of CD5 (T-cell)



Η κλινική έκβαση ασθενών με ΧΛΛ έχει αλλάξει αξιοσημείωτα τις τελευταίες δεκατίες

Νέες θεραπείες (πυριρινικά ανάλογα (fludarabine), μονοκλωνικά αντισώματα (rituximab, alemtuzumab) μπορούν να εξαλείψουν πλήρως τον λευχαιμικό κλώνο των Β-κυττάρων → Πλήρη ύφεση ↑

Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της ΕΥΝ έχει μεγάλη κλινική σημασία καθώς φαίνεται να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για τη διατήρηση της ύφεσης και την ολική επιβίωση

ΕΥΝ στη ΧΛΛ: Τι σημαίνει?

- Ελάχιστη Υπολειπόμενη Νόσος (Minimal Residual Disease, MRD) είναι η νόσος που οφείλεται στην παρουσία ανθεκτικών στη θεραπεία λευχαιμικών κυττάρων μη ανιχνεύσιμων με συμβατικές κλινικές μεθόδους

Review article

This is a new version, updated and corrected, as of December 8, 2008.

Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines

Michael Hallek,¹ Bruce D. Cheson,² Daniel Catovsky,³ Federico Caligaris-Cappio,⁴ Guillaume Dighiero,⁵ Hartmut Döhner,⁶ Peter Hillmen,⁷ Michael J. Keating,⁸ Emili Montserrat,⁹ Kanti R. Rai,¹⁰ and Thomas J. Kipps¹¹

5.9. Minimal residual disease

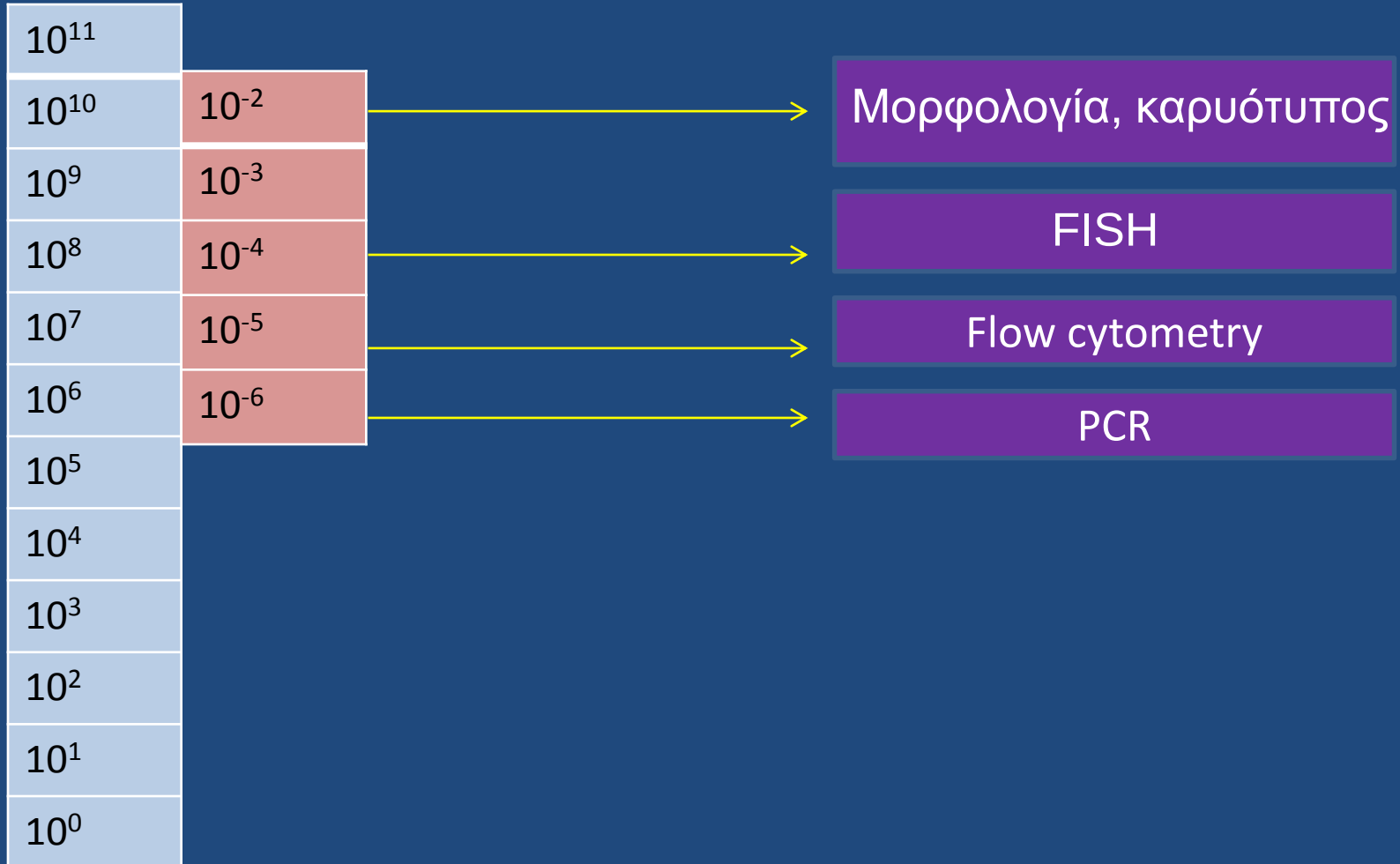
The complete eradication of the leukemia is an obvious desired endpoint. New detection technologies, such as multicolor flow cytometry and real-time quantitative PCR, have determined that many patients who achieved a CR by the 1996 NCI-WG guidelines have detectable MRD. Although eradication of MRD may improve prognosis, prospective clinical trials are needed to define whether additional treatment intended solely to eradicate MRD provides a significant benefit to clinical outcome. The techniques for assessing MRD have undergone a critical evaluation and have become fairly standard.⁶⁰ Either 4-color flow cytometry (MRD flow) or allele-specific oligonucleotide PCR is reliably sensitive down to a level of approximately one CLL cell in 10 000 leukocytes. As such, patients will be defined as having a clinical remission in the absence of MRD when they have blood or marrow with less than one CLL cell per 10 000 leukocytes. The blood generally can be used for making this assessment except during the period within 3 months of completing therapy, particularly for patients treated with alemtuzumab, rituximab, and other antibodies targeting CLL. In such

**Κλινική ύφεση
EYN $\leq 10^{-4}$**

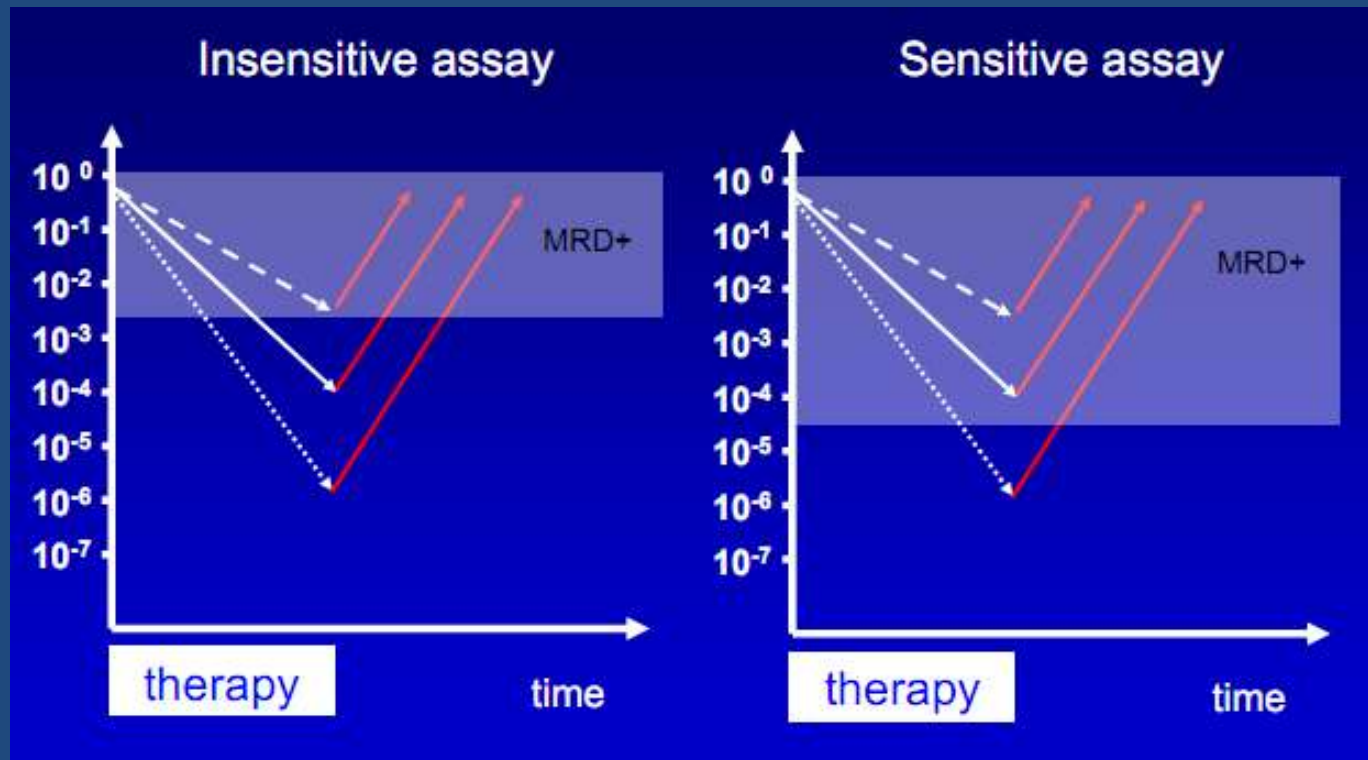
Ευαισθησία τεχνικών στην ανίχνευση νόσου

Λευχαιμικά
κύτταρα

Ευαισθησία



Γιατί είναι σημαντική η ευαισθησία της μεθόδου??



- Η μη ευαίσθητη τεχνική δεν θα ταυτοποιήσει σωστά το βάθος της ύφεσης, ούτε την ανάκαμψη της νόσου

Απαιτήσεις μεθόδων προσδιορισμού ΕΥΝ

- **Ειδικότητα:** διαχωρισμός παθολογικών-φυσιολογικών κυττάρων
- **Ευαισθησία:** να ανιχνεύει τουλάχιστον 1 κακόηθες κύτταρο μέσα σε ένα υπόστρωμα $\geq 10,000$ φυσιολογικών κυττάρων
- **Εφαρμοστικότητα:** να είναι διαθέσιμη πρακτικά σε κάθε ασθενή
- **Αναπαραγωγιμότητα:** στανταρισμένη μέθοδος
- **Ταχύτητα:** τα αποτελέσματα να είναι διαθέσιμα μέσα στα χρονικά πλαίσια λήψης αυτών των αποφάσεων
- **Λογικό κόστος**

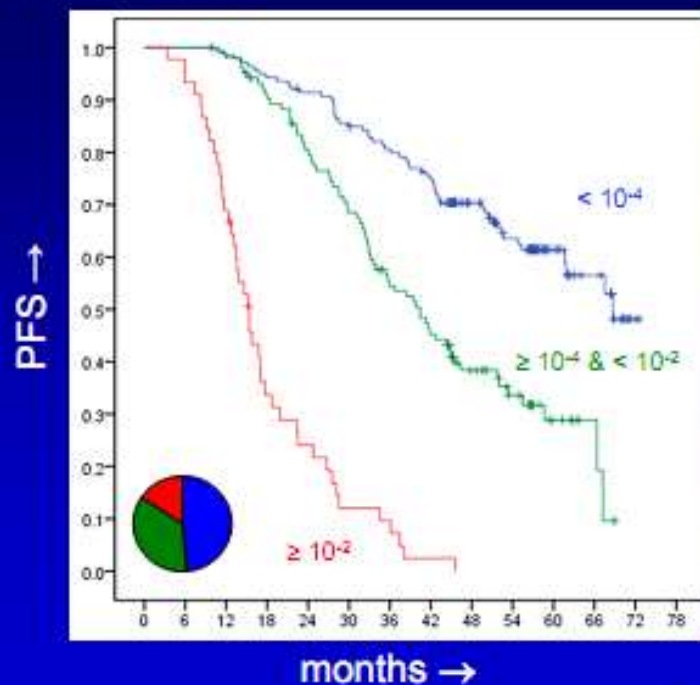
ΕΥΝ στη ΧΛΛ: Ποια η κλινική σημασία?

- Προγνωστικός παράγοντας για την εξέλιξη νόσου (Progression Free Survival, PFS) και την ολική επιβίωση (Overall Survival, OS)
 - Ανεξάρτητος από τη θεραπεία
 - Ανεξάρτητος από άλλους προγνωστικούς παράγοντες (IGHV, κυτταρογενετική, σταδιοποίηση)
- Προγνωστικός παράγοντας GvL μετά την αλλογενή μεταμόσχευση

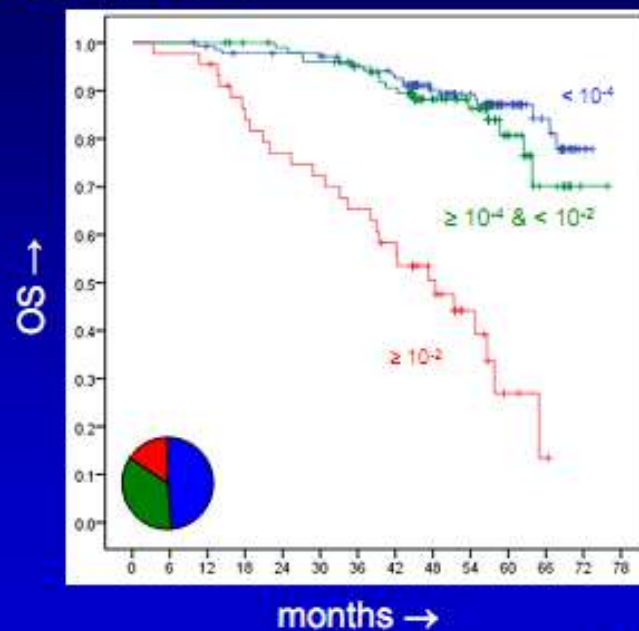
Προκαταρκτικά δεδομένα για τα επίπεδα της
MRD στη Β-ΧΛΛ μετά την έφοδο:

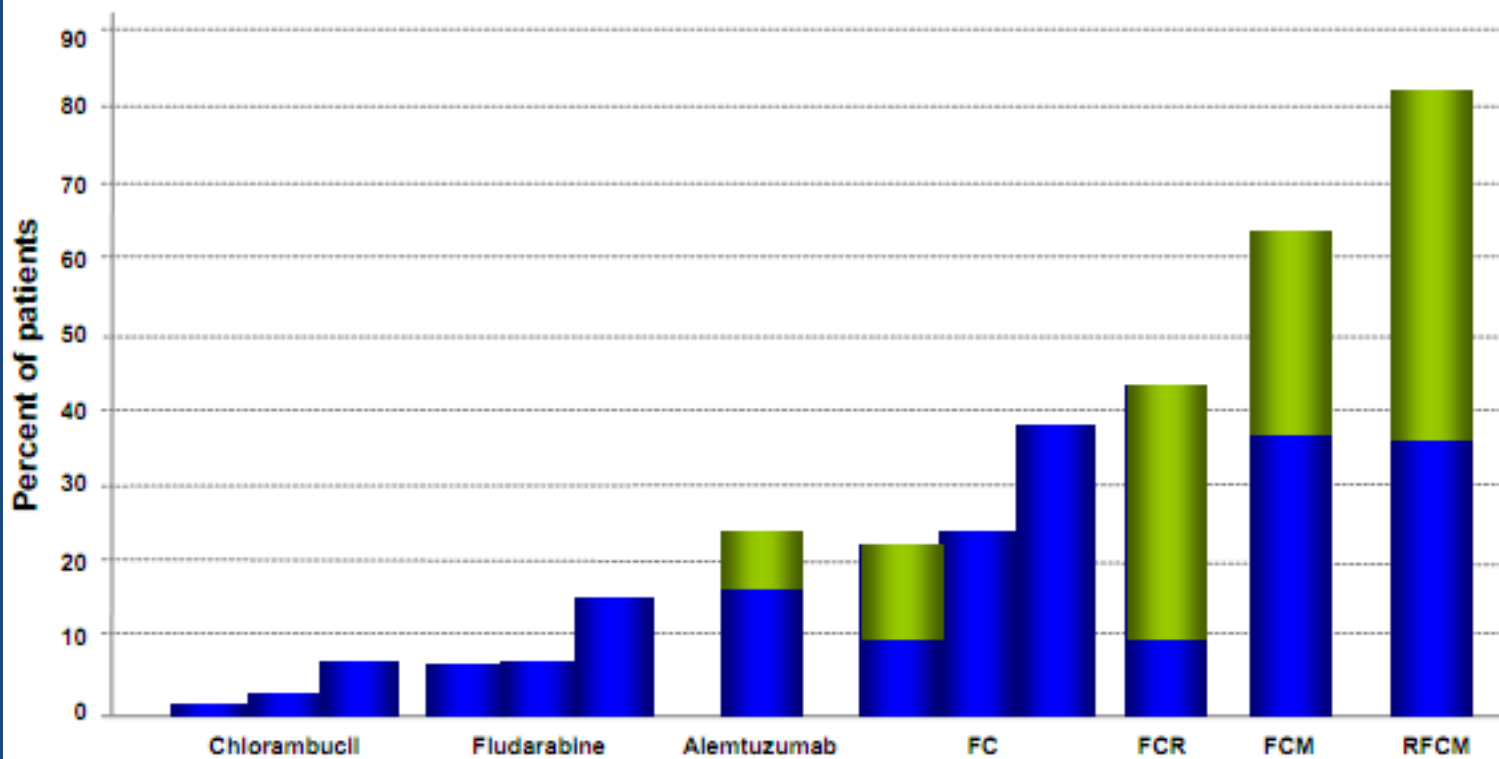
- $MRD < 10^{-4}$ μέσο διάστημα εξέλιξης της νόσου (PFS) 6 έτη
- $MRD \geq 10^{-4}$ PFS 2.5 έτη
- Μικρότερο για $\geq 10^{-2}$

- GCLLSG CLL8 trial -



- GCLLSG CLL8 trial -





MRD^{NEG}

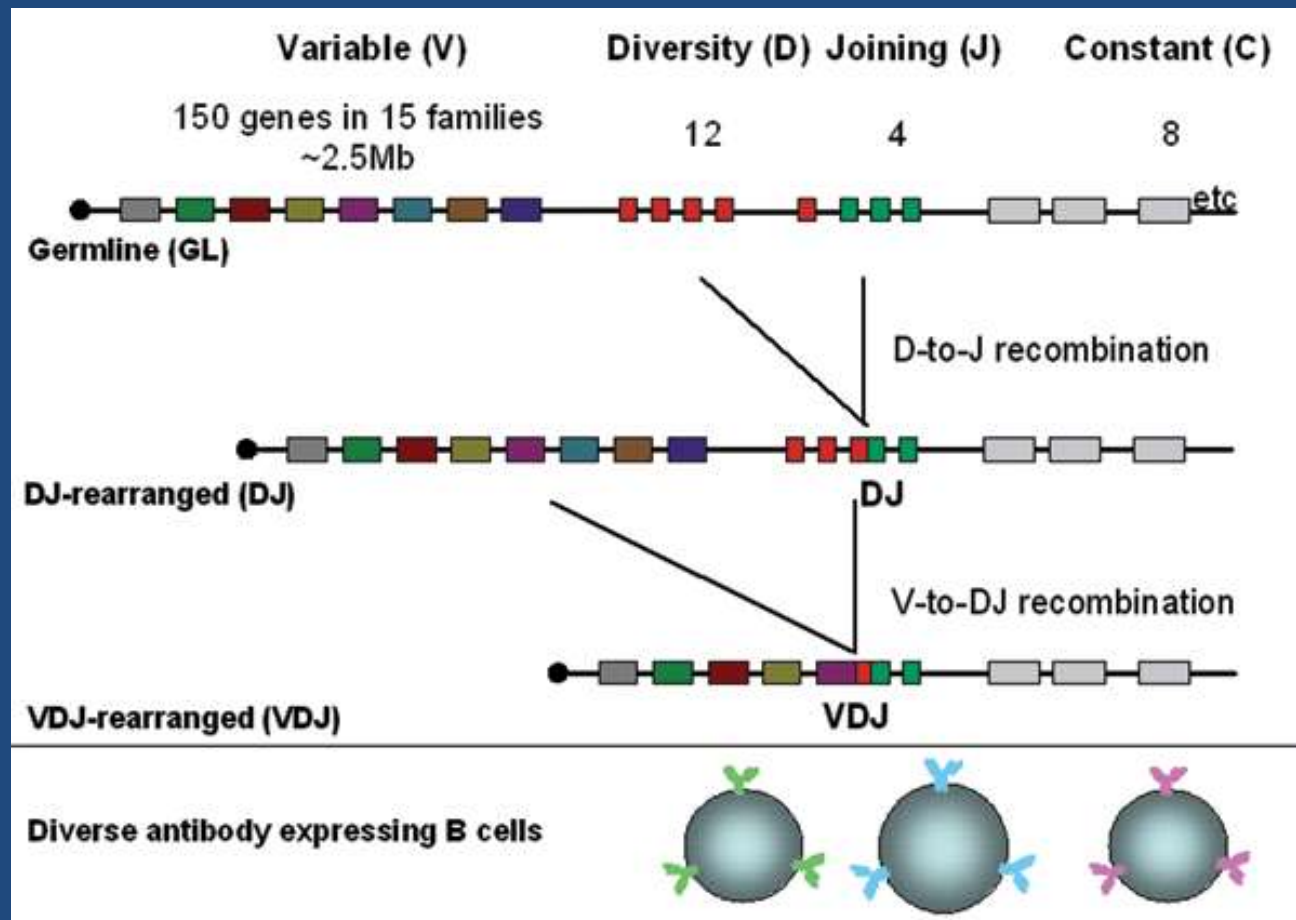
MRD^{POS}

MRD^{NEG} Αυξανόμενα ποσοστά πλήρους ύφεσης

ΕΥΝ στη ΧΛΛ: Πως ανιχνεύεται?

- I. PCR Μοριακές τεχνικές
- II. Κυτταρομετρία ροής

Οι μοριακές τεχνικές βασίζονται στην ανίχνευση κλωνικότητας μετά την αναδιάταξη των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης των Β κυττάρων



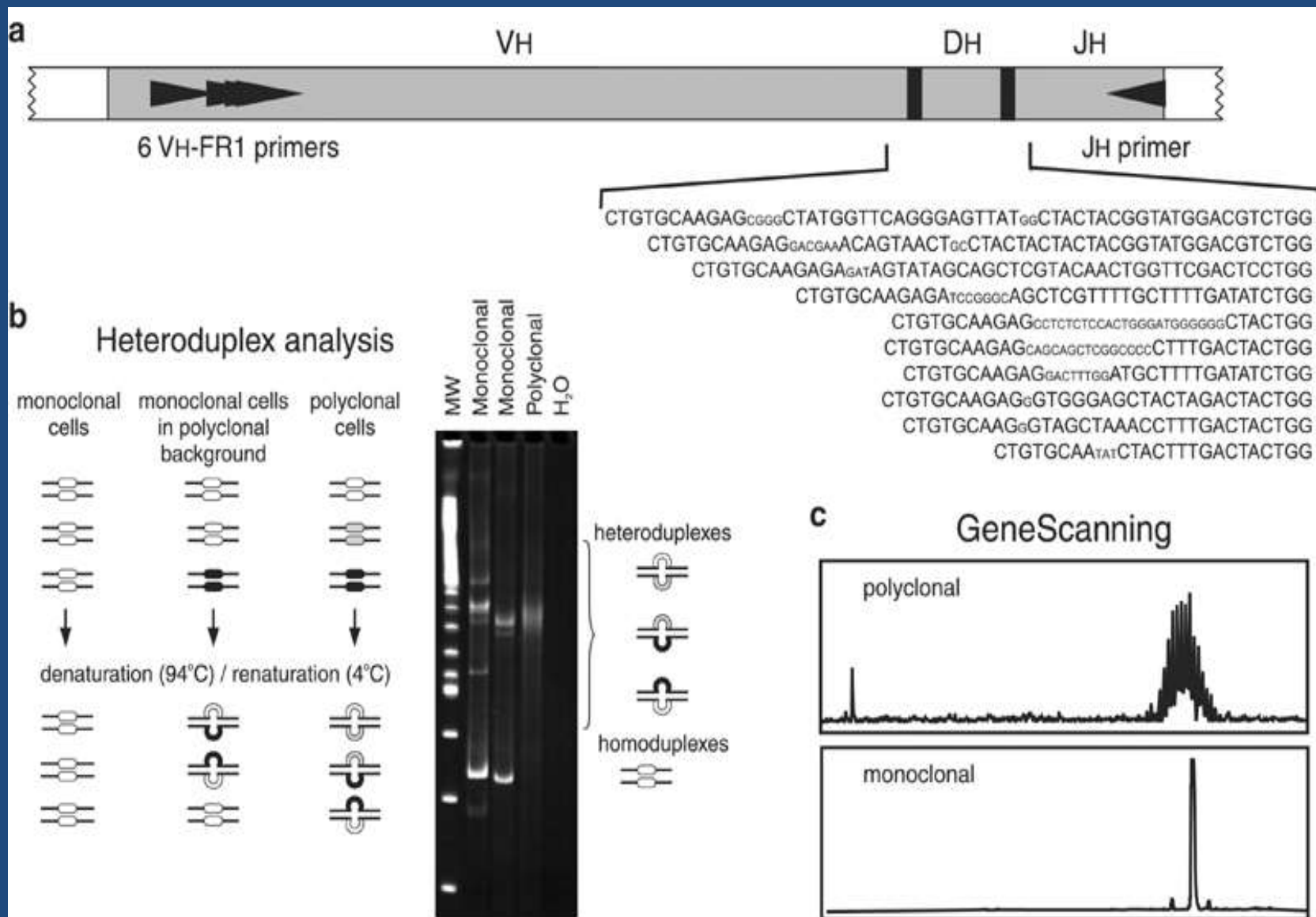
ΕΥΝ στη ΧΛΛ: Πως ανιχνεύεται?

I. Μοριακές τεχνικές βασισμένες στην PCR

-Χαμηλής ευαισθησίας: Consensus IgH-PCR

Χρησιμοποιούνται εκκινητές PCR ευρείας χρήσης που προσδένονται στις συνδετικές περιοχές των ανασυνδυασμένων γονιδίων (consensus universal primers)

Ωστόσο η ευαισθησία της μεθόδου 10^{-2} - 10^{-3}



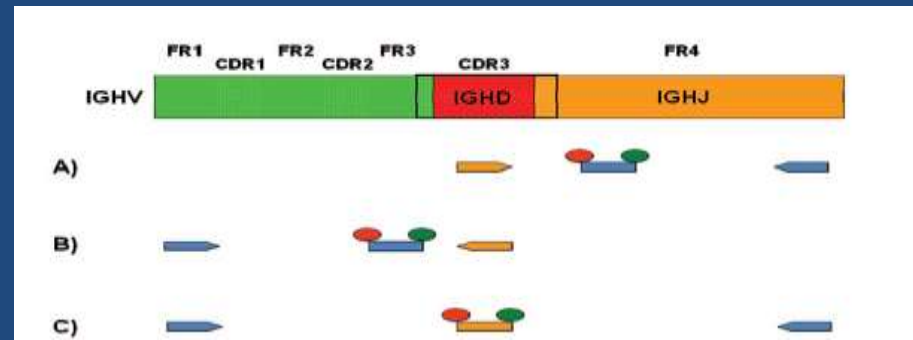
ΕΥΝ στη ΧΛΛ: Πως ανιχνεύεται?

-Υψηλής ευαισθησίας: ASO IgH RQ-PCR

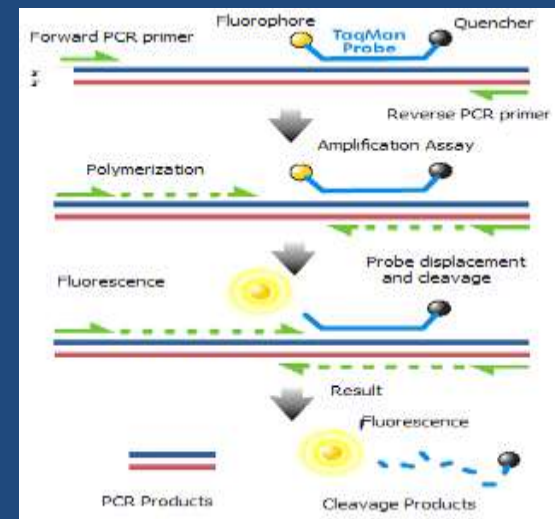
Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο με ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές σχεδιασμένους για τον κλώνο κάθε ασθενούς

Ευαισθησία της μεθόδου 10^{-4} - 10^{-5}

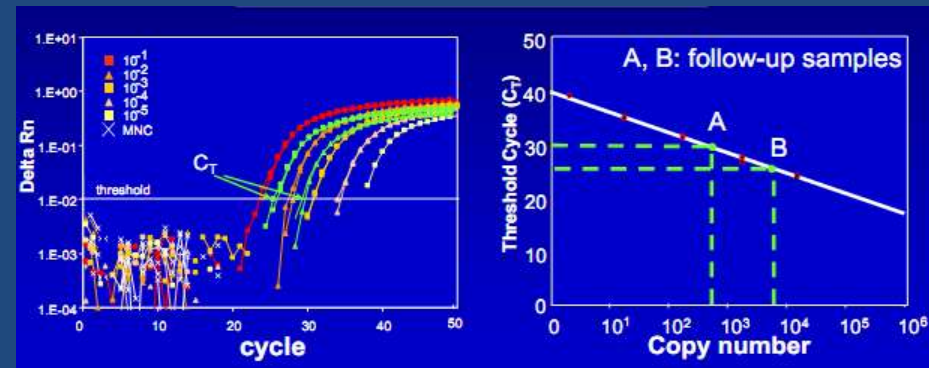
1. Για κάθε ασθενή σχεδιάζεται ένας εκκινητής ή ιχνηθέτης ειδικά για τη CDR3 διότι είναι η πιο μεταβλητή και “clone-specific” περιοχή των παρατηρούμενων αναδιατάξεων



2. RQ-PCR με εκπομπή φθορισμού



3. Ποσοτική ανάλυση των ASO αντιγράφων χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη από ένα γονίδιο αναφοράς π.χ αλβουμίνης

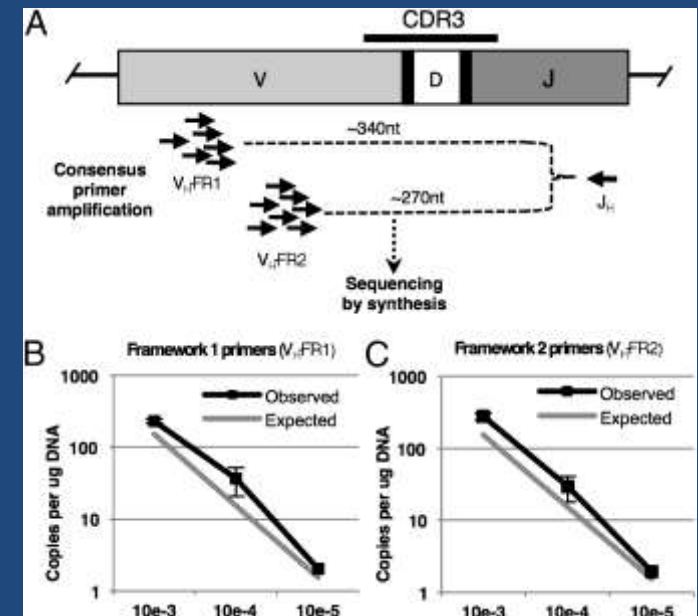


- Αλληλούχιση υψηλής απόδοσης High Throughput Sequencing

Ανάγνωση της IGHV-IGHD-IGHJ αλληλουχίας

Ευαισθησία της μεθόδου 10^{-5} - 10^{-6}

Δεν έχει αξιολογηθεί το κόστος, εγκυρότητα, επαναληψιμότητα, αξιοπιστία



II. Κυτταρομετρία Ροής

Η MRD κυτταρομετρική ανάλυση ταυτοποιεί CLL κύτταρα ως ένα πληθυσμό λευκοκυττάρων τα οποία εμφανίζουν ένα συνδυασμό δεικτών που στη φυσιολογική αιμοποίηση δεν υπάρχουν:

- Έκφραση του CD5 (κανονικά ανευρίσκεται στα T-λεμφοκύτταρα και σε ένα μικρό υποπληθυσμό πρόδρομων B-λεμφοκυττάρων)
- Επικράτηση είτε κ είτε λ ελαφρών αλυσίδων ανοσοσφαιρίνης
- Υποέκφραση είτε υπερέκφραση αντιγόνων στα CLL B κύτταρα σε σύγκριση με τα CD5+ πρόδρομα B κύτταρα

ORIGINAL ARTICLE

International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia

AC Rawstron¹, N Villamor^{2,3}, M Ritgen⁴, S Böttcher⁴, P Ghia⁵, JL Zehnder⁶, G Lozanski⁷, D Colomer^{2,3}, C Moreno^{2,3}, M Geuna⁸, PAS Evans¹, Y Natkunam⁹, SE Coutre⁶, ED Avery⁵, LZ Rassenti⁹, TJ Kipps⁵, F Caligaris-Cappio², M Kneba⁴, JC Byrd⁷, MJ Hallek¹⁰, E Montserrat^{2,3} and P Hillmen¹

Μελετήθηκαν 50 πιθανοί συνδυασμοί για την ανάδειξη εκείνων που θα διαχωρίζουν τα ΧΛΛ κύτταρα

Επιλέχθηκαν 9 συνδυασμοί με βάση την ικανότητα για ταυτοποίηση των Β-κυτταρικών πληθυσμών σε σχέση με το συνδυασμό CD19/CD5/κ/λ και διακρίθηκαν 3

- CD10/CD24/CD43, CD10/CD5/CD43, CD10/integrinβ7/CD43, CD10/integrinβ7/CD5, CD11a/integrinβ7/CD5, CD20/CD38/CD5, CD20/CD43/CD5, CD20/integrinβ7/CD5, CD21/CD48/CD43, CD21/CD48/CD5, CD21/CXCR5/CD5, CD21/integrinβ7/CD5, CD24/CCR6/CD43, CD24/CD27/CD38, CD24/CD40/CD5, CD24/CD48/CD43, CD24/CD48/CD5, CD24/CXCR5/CD43, CD24/CXCR5/CD5, CD24/integrinβ7/CD43, CD24/integrinβ7/CD5, CD31/CXCR5/CD5, CD37/CCR6/CD43, CD37/CD5/CD43, CD37/CD79b/CD43, CD37/CXCR5/CD5, CD37/integrinβ7/CD43, CD40/CD48/CD43, CD40/CD48/CD5, CD40/CXCR5/CD5, CD40/integrinβ7/CD5, CD43/CD23/CD5, CD43/CD81/CD38, CD43/CD81/CD5, CD44/integrinβ7/CD43, CD44/integrinβ7/CD5, CD48/CXCR5/CD5, CD48/integrinβ7/CD5, CD48/LAIR-1/CD5, CD48/MPG-1/CD5, CD5/CCR6/CD43, CD5/CXCR5/CD43, CD70/integrinβ7/CD5, CD79b/CD21/CD43, CD79b/CD24/CD43, CD79b/CD38/CD43, CD79b/CD39/CD43, CD79b/CD40/CD43, CD79b/CD48/CD43, CD79b/CD5/CD43, CD79b/CD81/CD43, CD79b/CXCR5/CD43, CD79b/CXCR5/CD5, CD79b/integrinβ7/CD5, CD81/CD22/CD5



Antibody Combination	Inter-operator variability (CV) Median (range)	% false positive of B-cells Median (range)
CD43/CD79b/CD19/CD5	9.2 (3.9 - 22.7)	0.8 (0.2 - 3.1)
CD81/CD22/CD19/CD5	12.6 (6.2 - 23.7)	0.5 (0.2 - 1.3)
CD20/CD38/CD19/CD5	13 (8 - 18.6)	0.3 (0 - 0.7)
CD20/Integrinβ7/CD19/CD5	14.7 (5.6 - 28.5)	1.5 (0.6 - 5.4)
CD43/CD23/CD19/CD5	22 (7.3 - 40.2)	4.3 (0 - 25)
CD20/CD5/CD19/CD43	22.8 (5 - 83.7)	2.4 (0.2 - 10.5)
Kappa/Lambda/CD19/CD5	29.5 (7.2 - 76.1)	5.3 (0.3 - 13.5)
CD37/CD79b/CD19/CD43	31.8 (13.1 - 53.6)	4.8 (2.3 - 9.6)
CD38/CD5/CD19/CD43	32.2 (8.3 - 58.2)	1.1 (0.2 - 4.1)
CD24/CXCR5/CD19/CD43	48.2 (26.9 - 64.2)	4.5 (3 - 6.9)

Το διεθνές Panel τετραχρωμίας

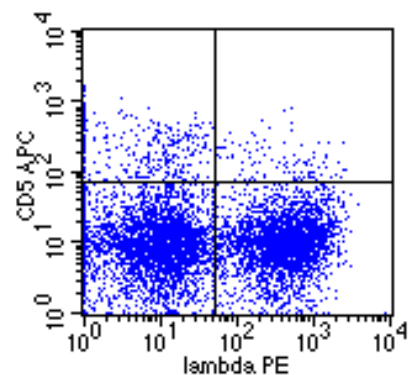
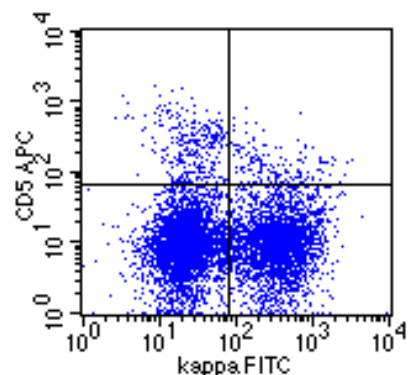
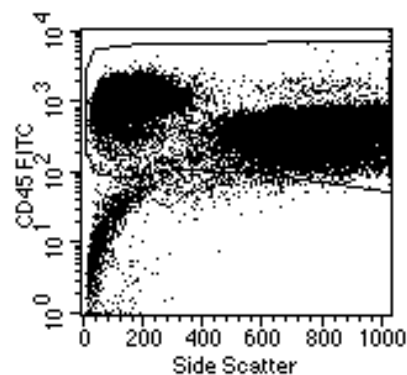
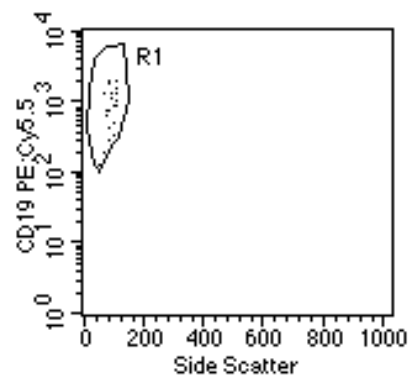
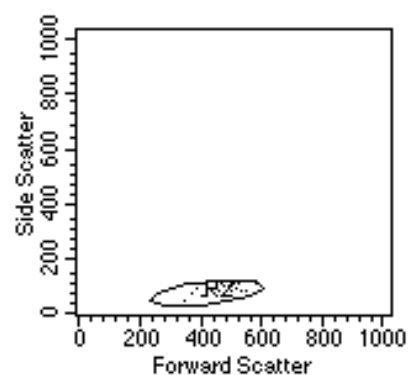
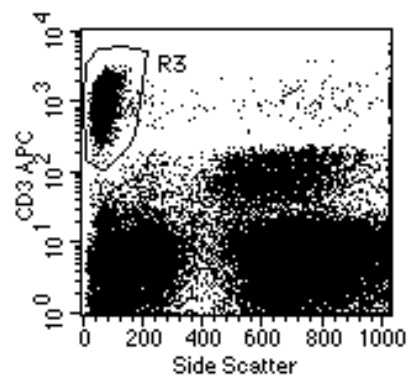
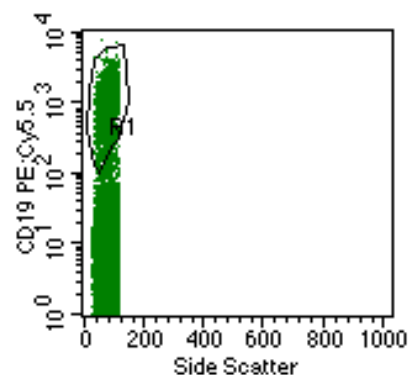
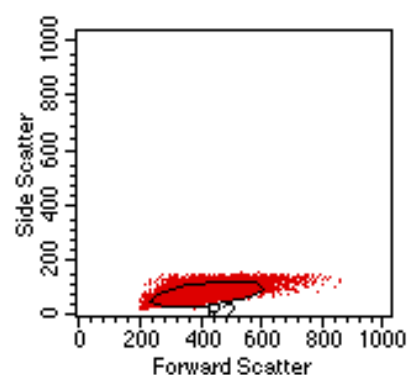
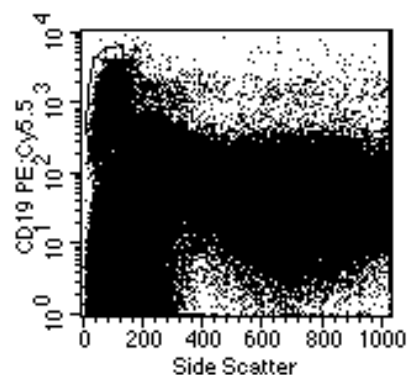
Rawstron et al. Leukemia 2007

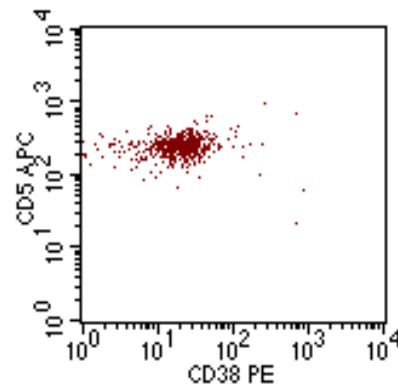
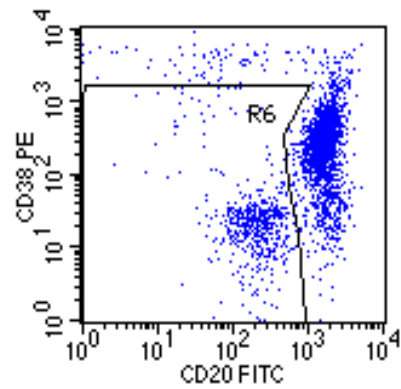
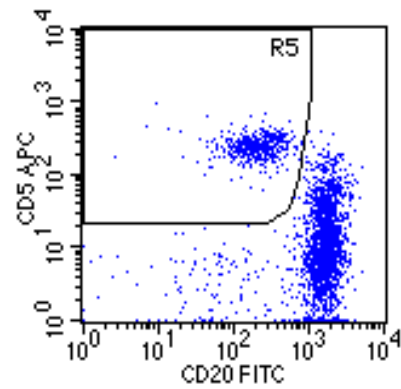
FITC	PE	PerCPCy5.5	APC	Aim
kappa	lambda	CD19	CD5	Clonal assessment
CD45	CD14	CD19	CD3	Limit of detection
CD20	CD38	CD19	CD5	CLL quantification
CD81	CD22	CD19	CD5	CLL quantification
CD79b	CD43	CD19	CD5	CLL quantification

1. Εκτίμηση της κλωνικότητας

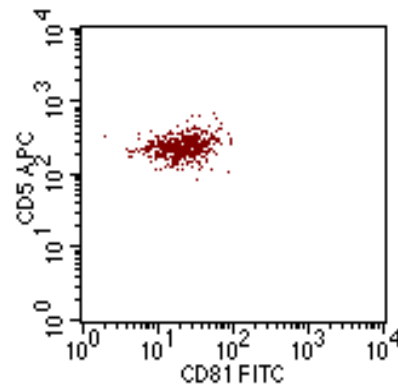
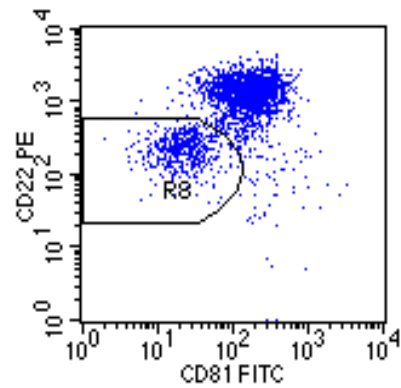
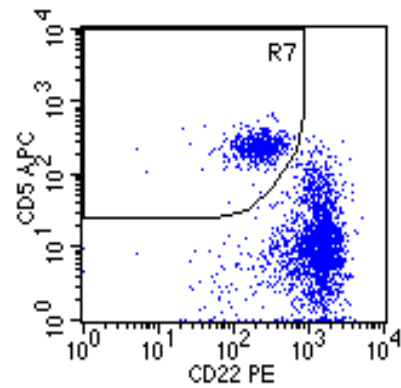
2. Μέτρηση CD19+ B λεμφοκυττάρων ως ποσοστό του συνολικού αριθμού CD45+ λευκοκυττάρων και επιμόλυνση CD19 θύρας με μη B-κύτταρα (CD3+)

3-5. Ταυτοποίηση ΧΛΛ κυττάρων σε ένα πολυκλωνικό λεμφοκυτταρικό πληθυσμό, όχι μεμονωμένη χρήση λόγω μειωμένης ευαισθησίας στην άτυπη ΧΛΛ (χαμηλή έκφραση CD5/CD43, έντονη CD20/CD79b)

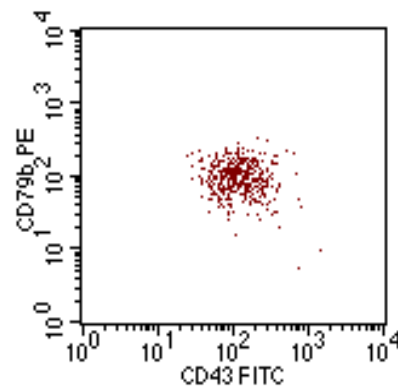
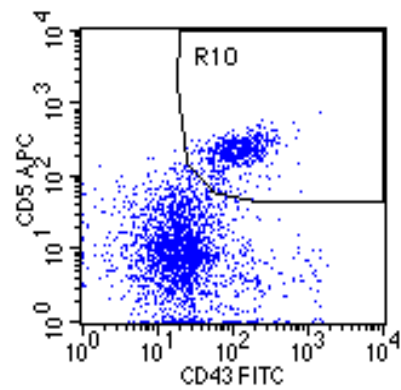
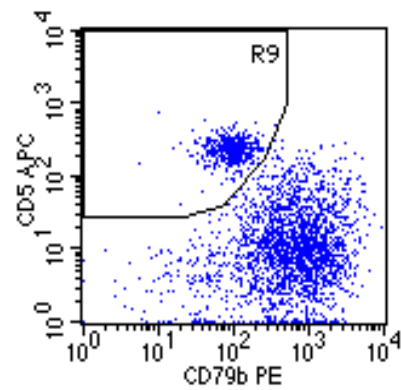




CD20/CD38/CD19/CD5

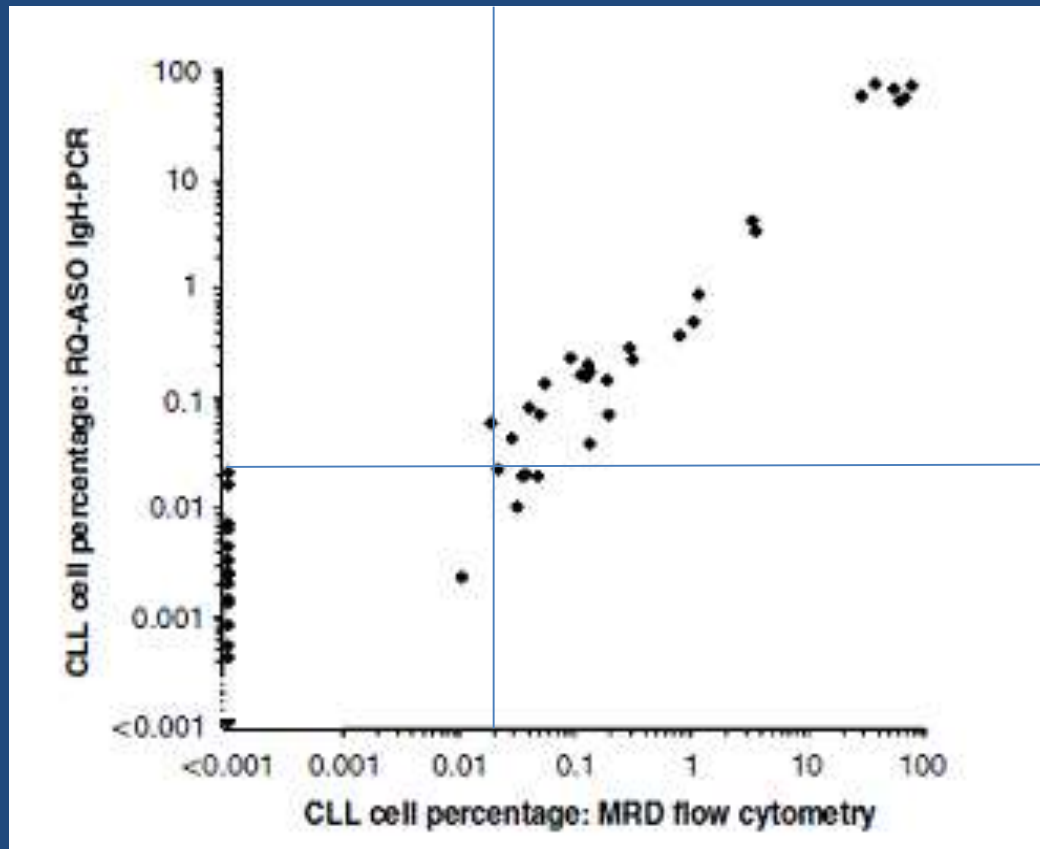


CD22/CD81/CD19/CD5



CD43/CD79b/CD19/CD5

MRD Flow vs. IgH-RQ PCR

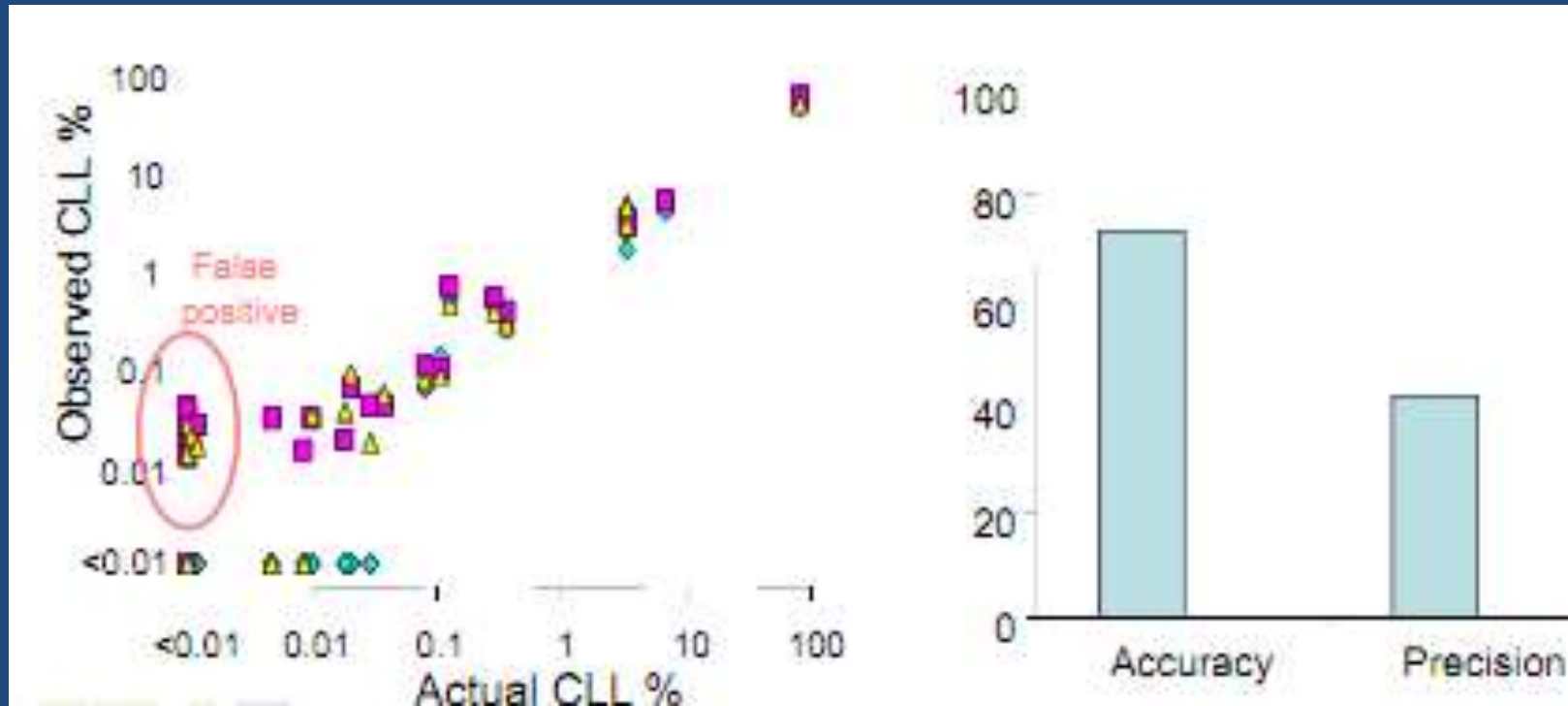


Υπάρχει συσχέτιση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων στην ανίχνευση ΧΛΛ κυττάρων όταν αυτά είναι πάνω από 0.01%

Σε μικρότερα ποσοστά η IgH RQ-PCR εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία

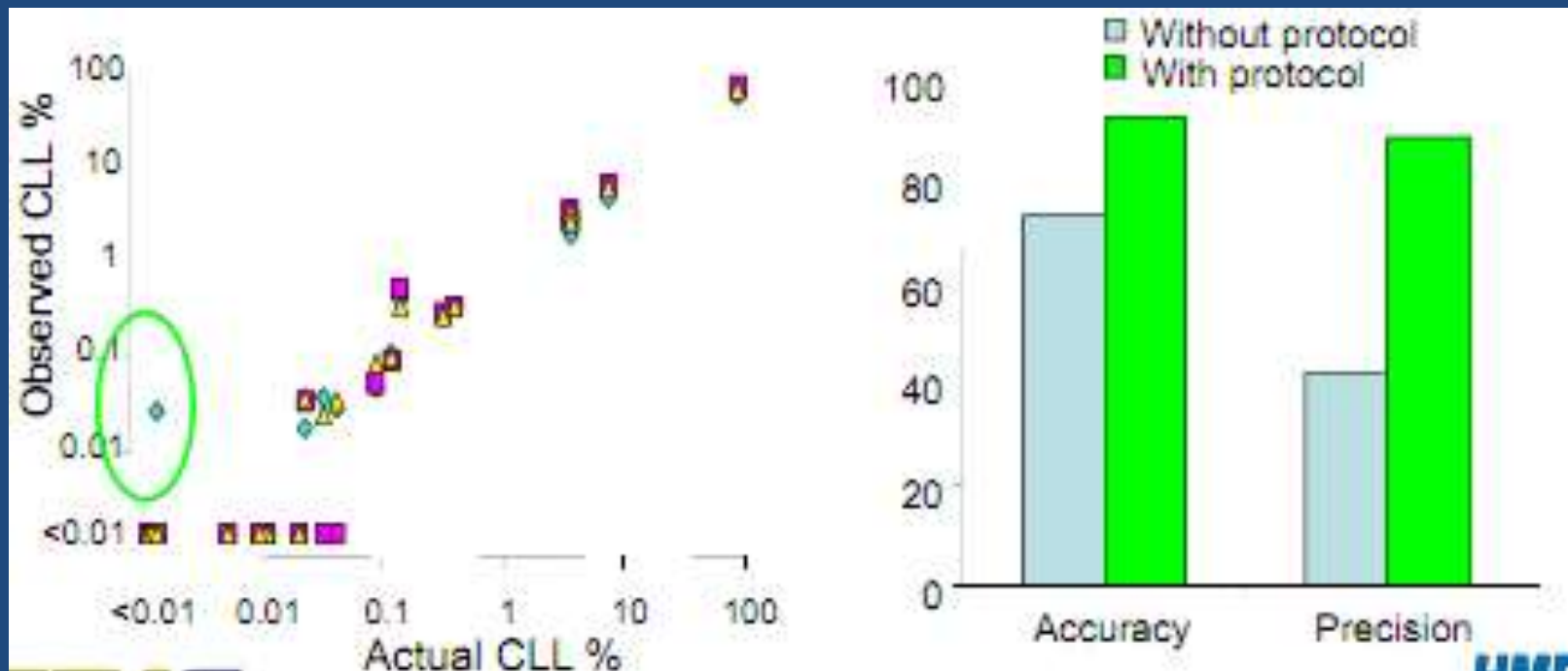
Μπορεί όμως οποιοσδήποτε χειριστής να εκτελέσει το πρωτόκολλο???

Χειριστές με εμπειρία στην κυτταρομετρία ροής αλλά όχι στην MRD ανάλυση



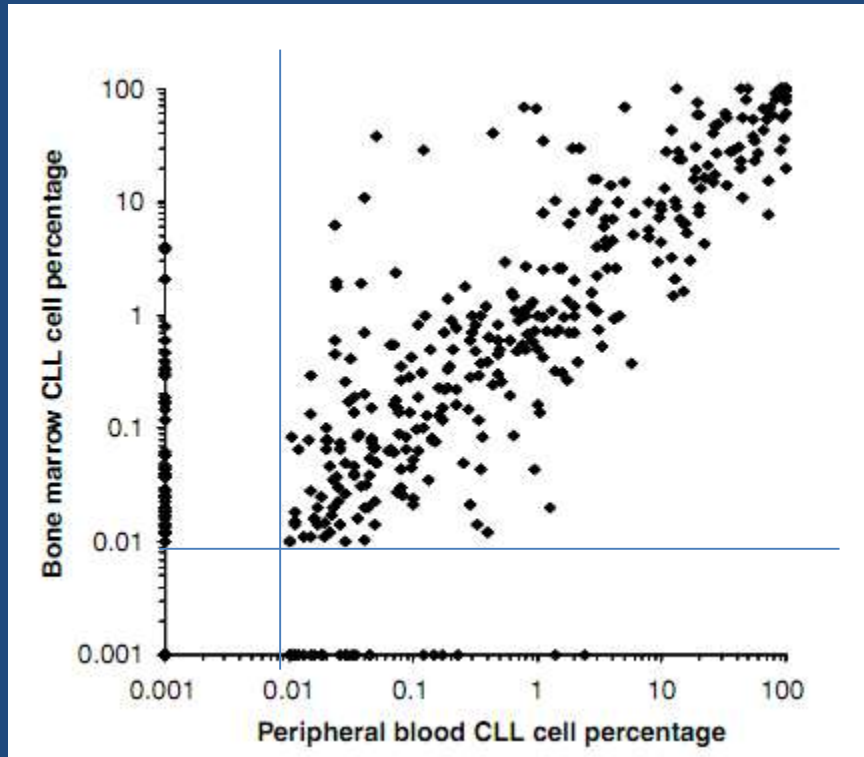
Φτωχή ακρίβεια για δείγματα με 0.01-0.1% ΧΛΛ κύτταρα

Χειριστές με εμπειρία στην κυτταρομετρία ροής αλλά όχι στην MRD ανάλυση: χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο



Αύξηση κατά 19% της ακρίβειας και κατά 44% ειδικότητας

Περιφερικό αίμα ή μυελός για την εκτίμηση της νόσου?



Τα αποτελέσματα της ανάλυσης συμφωνούν κατά 79.5% Εξαρτώνται από τον τύπο της θεραπείας (rituximab, alemtuzumab) και το χρονικό διάστημα μετά τη θεραπεία

Μετά την πάροδο 3 μηνών από τη θεραπεία με rituximab, alemtuzumab ή υπό άλλο θεραπευτικό σχήμα η συσχέτιση των αποτελεσμάτων φτάνει στο 87%

MRD Πρωτόκολλο 4χρωμίας

- Πρωτόκολλο 4 χρωμάτων και 5 συνδυασμών εφαρμόσιμο σε όλους τους ασθενείς
- Κατάλληλο για περιφερικό αίμα και μυελό των οστών
- Εφαρμόσιμο σε όλα τα πρωτόκολλα θεραπείας μέχρι στιγμής
- Όριο ανίχνευσης 0.01% (10^{-4})
- Χρειάζονται 50 events σε τουλάχιστον δύο MRD tubes από 500.000 events
- ακρίβεια 95.7%
- ευαισθησία 91.1%
- ειδικότητα 98.8%
- Εκπαίδευση κρίνεται απαραίτητη ακόμη και για πεπειραμένους χειριστές



FLOW CYTOMETRY

Harder than it looks.

Το διεθνές εναρμονισμένο πρωτόκολλο των 4 χρωμάτων για την MRD ανάλυση χρησιμοποιείται ευρέως, ωστόσο υπόκειται σε περιορισμούς:

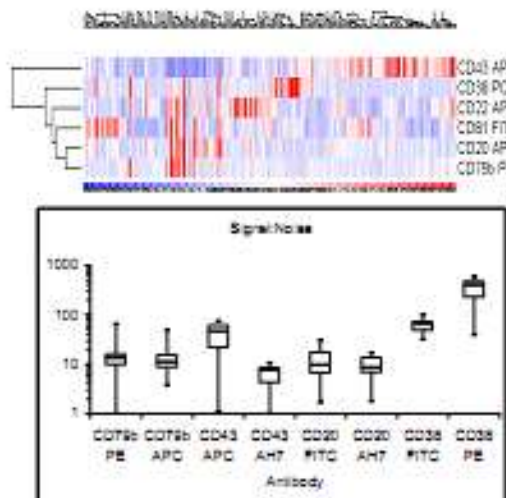
- Χρονοβόρο
- Δεν είναι απαραίτητο σε πολλούς σε ασθενείς με προφανή παρουσία της ΧΛΛ
- Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων μπορεί να είναι δύσκολη για μη-εξειδικευμένα εργαστήρια
- Επιπλέον η νέα γενιά αναλυτών κυτταρομετρίας ροής προσφέρει τη δυνατότητα για την ανάπτυξη νέων MRD πρωτοκόλλων με σκοπό την εξοικονόμηση του χρόνου, χρήματος και την απλοποίηση της διαδικασίας

ORIGINAL ARTICLE

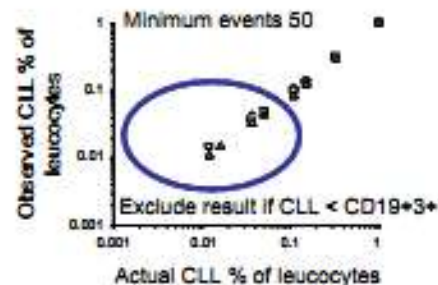
Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL

AC Rawstron^{1,2}, S Böttcher³, R Letestu^{4,5}, N Villamor⁶, C Fazi⁷, H Kartsios¹, RM de Tute¹, J Shingles¹, M Ritgen³, C Moreno⁸, K Lin⁹, AR Pettitt⁹, M Kneba³, E Montserrat⁶, F Cymbalista^{4,5}, M Hallek¹⁰, P Hillmen¹¹ and P Ghia⁷ on behalf of the European Research Initiative in CLL (ERIC)

Σχεδιασμός του πρωτοκόλλου 6 χρωμίας: συνδυασμοί αντισωμάτων, φθοριοχρωμάτων, περιορισμών



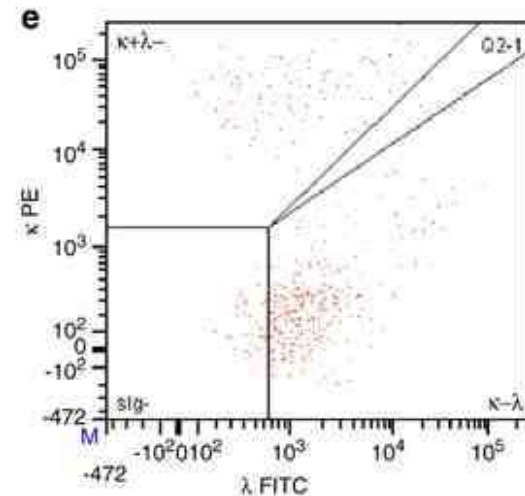
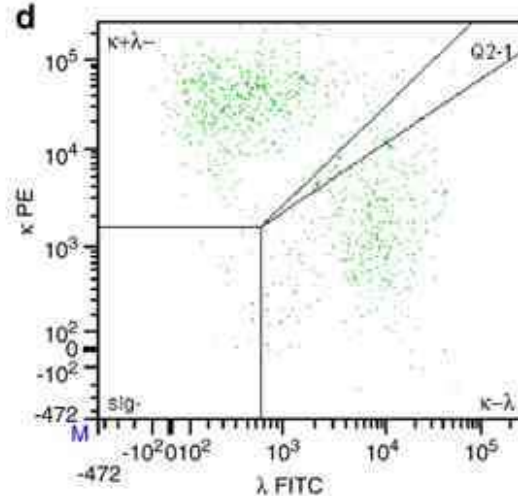
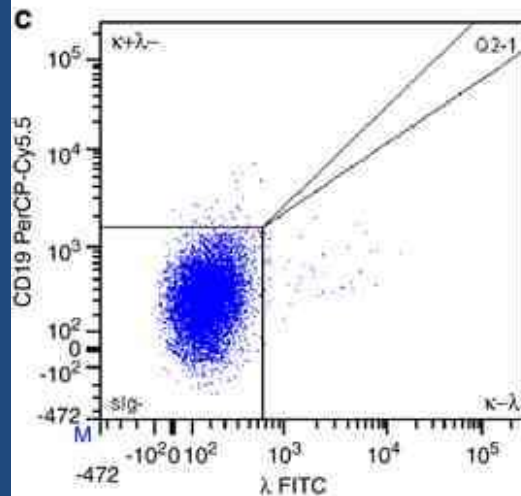
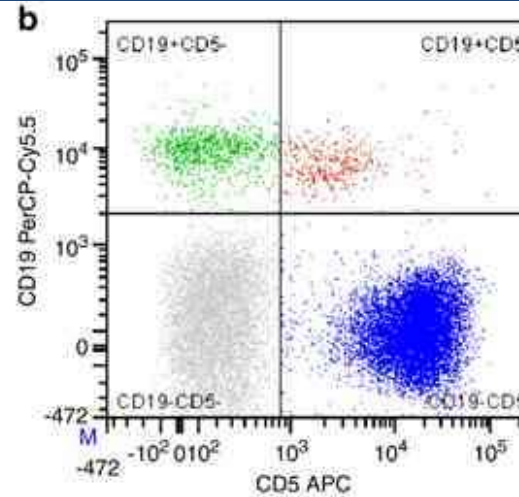
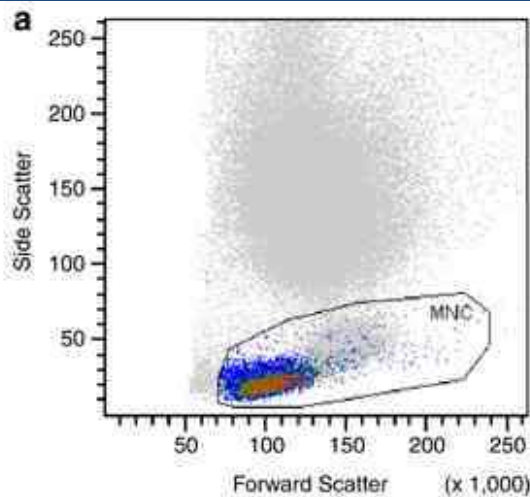
	T-test for # of cells classed as CLL with or without CD3	Regression slope for # of cells classed as CLL +/- CD3
CD20/79b/38	0.019	1.13
CD5/22/43	0.15	1.06
CD5/79b/43	0.89	1.05



Πρωτόκολλο εξαχρωμίας

FITC	PE	PerCP-Cy5.5	APC	PE-Cy7	APC-H7
lamda	kappa	CD19	CD5	-	-
CD3	CD38	CD5	CD79b	CD19	CD20
CD81	CD22	CD5	CD43	CD19	CD20

Αρχικό screening με ανάλυση της συνέκφρασης των CD19/CD5 και εκτίμηση της κλωνικότητας μέσω της επιφανειακής κ/λ έκφρασης

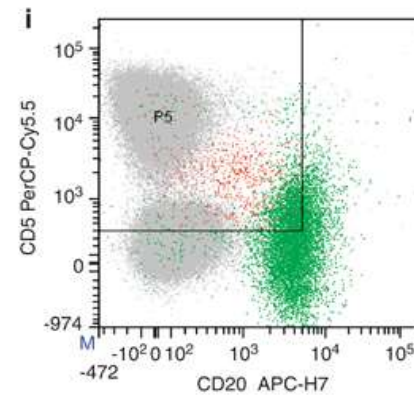
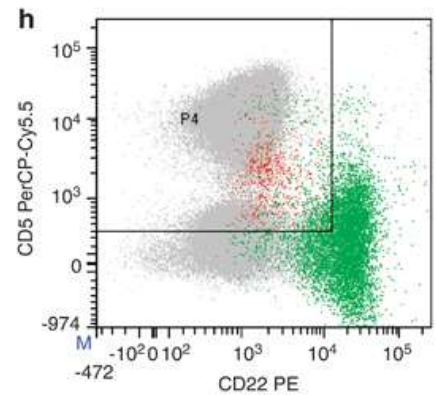
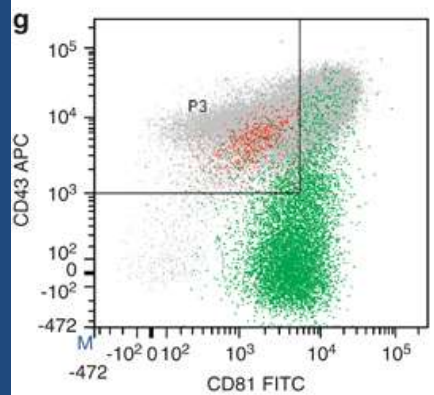
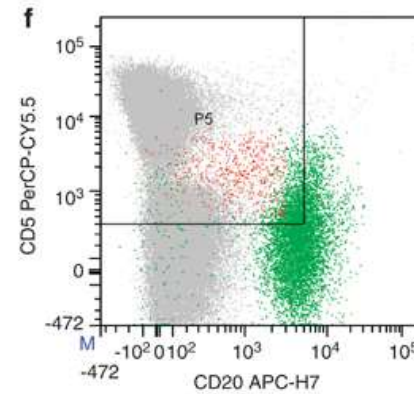
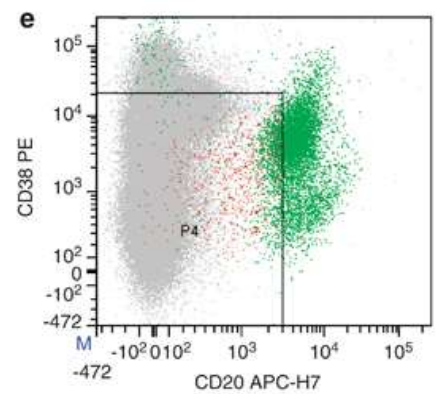
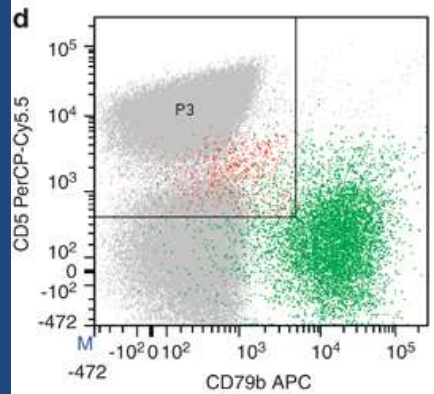
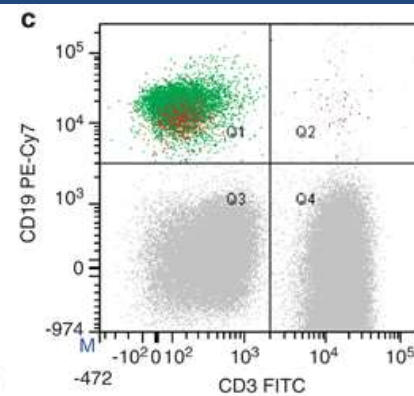
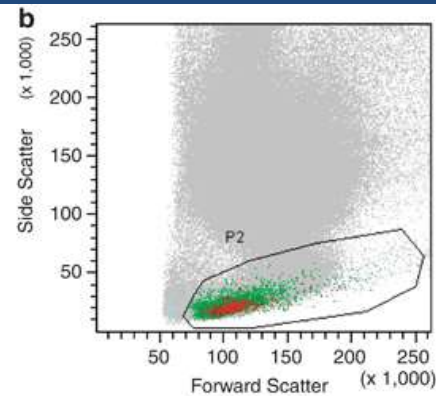
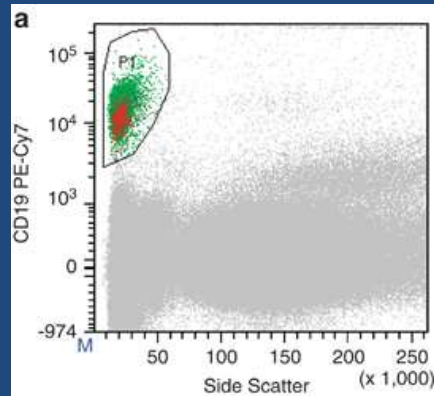


Όρια για την πρόβλεψη παρουσίας υπολειπόμενης ΧΛΛ χρησιμοποιώντας τον συνδυασμό CD5/CD19/κ/λ

- Το ποσοστό των CD19+ CD5+ >82%
- CD19+ CD5+ κ:λ $\leq 0,05:1$ ή $\geq 32:1$
ή CD19+ CD5+ slg- >54%

Θετική προγνωστική αξία 100%

Με βάση αυτά τα κριτήρια η MRD αξιολογήθηκε ορθά με 100% ειδικότητα σε 185/392 ασθενείς (47%)



a, b γίνεται gate των B- κυττάρων

c. Υπολογίζονται τα CD3+ στο gate των B

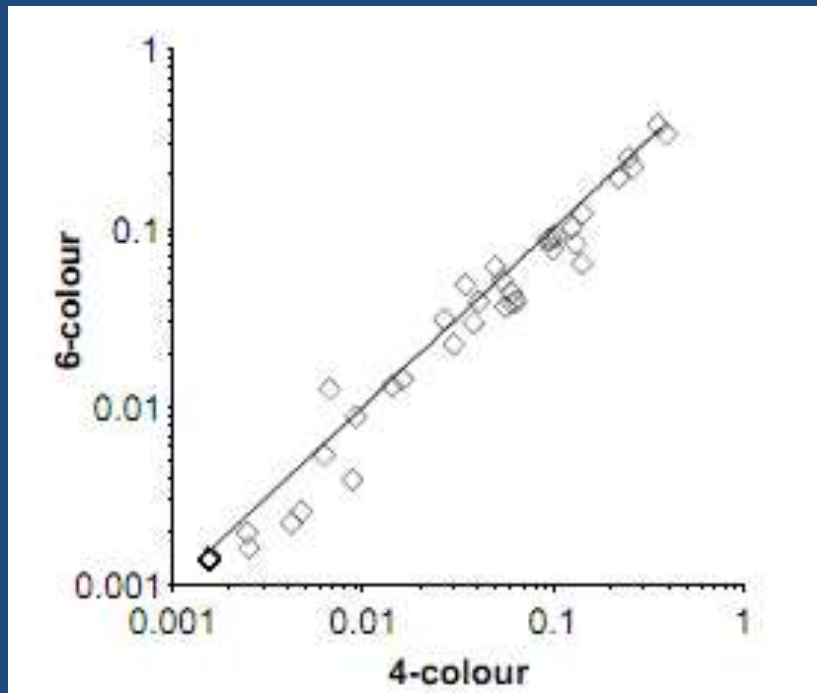
d.e.f ο πληθυσμός των ΧΛΛ κυττάρων σύμφωνα με την έκφραση των CD5, CD20,CD79b,CD38

g.h.i ο πληθυσμός των ΧΛΛ κυττάρων σύμφωνα με την έκφραση των CD5, CD20,CD22,CD43 CD81

CD3/CD38/CD79b statistics		
Population	#Events	%Total
All Events	500,000	100.000
Total B-cells	7,997	1.599
CLL cells	565	0.113
B-cells excluding CLL	7,432	1.486
CD19+CD3+ events	34	0.007

CD81/CD22/CD43 statistics		
Population	#Events	%Total
All Events	500,000	100.000
Total B-cells	4,460	1.692
CLL cells	616	0.123
B-cells excluding CLL	7,844	1.569

Το πρωτόκολλο εξαχρωμίας μπορεί να επιτύχει ανίχνευση στο 0.001% (10^{-5})



- Μελετήθηκαν 67 δείγματα με ΧΛΛ < 1%
- Συμφωνία ανίχνευσης της ΧΛΛ στο όριο 0.01%
 - 94,8% συνολικά
 - 100% όταν χρησιμοποιήθηκαν > 200.000 events σε κάθε tube
- Καλή γραμμικότητα στο επίπεδο του 0.001%

MRD Πρωτόκολλο 6χρωμίας

50% μείωση του χρόνου και απλοποίηση της ανάλυσης

Μείωση του κόστους

Δυνατότητα μέτρησης 500.000 events ή και περισσότερων σε δείγματα μετά θεραπείας τα οποία συνήθως είναι φτωχά κυττάρων

Ευαισθησία της μεθόδου από 0.001-0.01% (10^{-5} - 10^{-4}), συγκρίσιμη πλέον εκείνης των IgH RQ-PCR και HTS (ωστόσο η αναπαραγωγιμότητα ανίχνευσης ΧΛΛ κυττάρων σε αυτό το επίπεδο δεν έχει μελετηθεί ακόμη)

Κυτταρομετρία vs. Μοριακές ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Πολυπαραμετρική Κ.Ρ

- Ευρέως χρησιμοποιούμενη
- Ταχύτερη
- Δεν απαιτεί ιδιαίτερο εργαστηριακό εξοπλισμό
- Απαιτεί περισσότερο διαθέσιμο δείγμα (x20)
- Πρέπει να πραγματοποιηθεί άμεσα (48 ώρες)
- Ευαισθησία 10^{-4}

ASO-RQ-IgH-PCR

- Δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη
- Χρονοβόρα
- Εξειδικευμένη τεχνολογία
- Δαπανηρή
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε δείγματα αρχείου
- Ευαισθησία ίση ή κατά ένα λογάριθμο μεγαλύτερη της ΚΡ (10^{-4} - 10^{-5})

Μέθοδος εκλογής για στην κλινική πράξη είναι η πολυπαραμετρική ΚΡ διότι δίνει γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα

Όμως σε ερευνητικές μελέτες που αφορούν την εκκρίζωση της νόσου υπερισχύει η RQ-ASO-IgH-PCR λόγω της αυξημένης της ευαισθησίας

...Υπό μελέτη MRD πρωτόκολλο 8χρωμίας

Χρήση του συνδυασμού αντισωμάτων CD5 V450, CD81FITC, CD22 PerCP-Cy5.5, CD43 APC, CD3 V500-C, CD79b PECy7, CD20 APC-H7

- Σκοπός για επικύρωση της ανίχνευσης του πρωτοκόλλου στο 0.001 (10^{-5})
- Έλεγχος για δια-εργαστηριακή μεταβλητότητα
- Εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος του λόγου σήματος/ θόρυβος και της αντιστάθμισης φθορισμών

Original Article

**A Single Tube 10-Color Flow Cytometry Assay
Optimizes Detection of Minimal Residual
Disease in Chronic Lymphocytic Leukemia**

M. M. Sartor^{1*} and D. J. Gottlieb²

¹Flow Cytometry Unit, Institute of Clinical Pathology and Medical Research, Westmead Hospital,
Sydney, Australia

²Faculty of Medicine, University of Sydney, Sydney, Australia

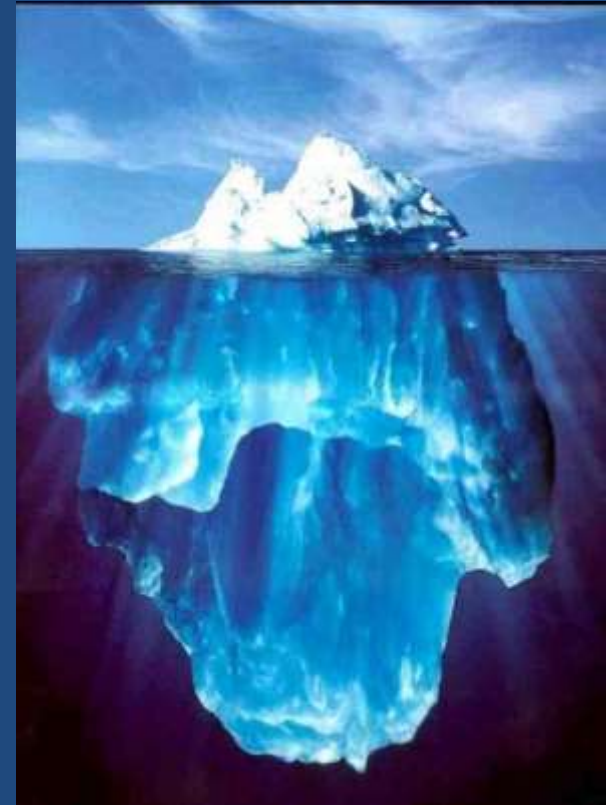
MRD πρωτόκολλο 10 χρωμίας

Χρήση του συνδυασμού αντισωμάτων CD81FITC, CD22PE, CD3ECD, CD5 PerCp5.5, CD20PECY7, CD79bAPC, CD38 A700, CD43APC ALEXA750, CD19eFluor450, CD45KO σε ένα tube

Προκαταρκτικά στοιχεία δείχνουν ότι η ευαισθησία της μεθόδου μπορεί να φτάνει το 10^{-5}

Δεν συνιστάται αυτή τη στιγμή ως ένα ρεαλιστικό πρωτόκολλο ανίχνευση της MRD λόγω μη διαθεσιμότητας κυτταρομετρητών που να υποστηρίζουν τη δεκαχρωμία, εξειδικευμένων χειριστών, κλινικών μελετών που να επικυρώνουν τη μέθοδο

- Η ταυτοποίηση της MRD πρέπει να γίνεται πάντα στα πλαίσια οργανωμένων πολυκεντρικών κλινικών μελετών και πρέπει πάντοτε να χρησιμοποιείται στανταρισμένη μέθοδος
- Φαίνεται να έχει κλινική σημασία ανεξάρτητη από τους άλλους προγνωστικούς παράγοντες
- Μέθοδος εκλογής είναι η πολυπαραμετρική KP
- Το πρωτόκολλο τετραχρωμίας εμφανίζει υψηλή ειδικότητα με ευαισθησία 10^{-4} περιορίζεται εξαιτίας του διαθέσιμου αριθμού λευκοκυττάρων
- Το πρωτόκολλο εξαχρωμίας δίνει ισότιμα αποτελέσματα με το πρωτόκολλο 4 χρωμίας αλλά απαιτεί λιγότερα αντιδραστήρια λιγότερα κύτταρα και απλοποιεί την ανάλυση



ΣΑΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ