Ondřej Hrušák, Tomáš Kalina, Ester Mejstříková, Martina Vášková, Veronika Kanderová, Michaela Nováková

Jak dobře imunofenotypizovat B-ALL

Diagnostický panel a zařazení B-ALL

	Vyšetřované znaky
Základní panel	iCD3, iCD22, iCD79a, iLysozym, iMPO, iTdT, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c,CD14, CD15, CD19, CD20, CD33, CD34, CD38, CD45, CD56, CD66c, CD99, CD117, HLA DR, CD371
Panel pro B řadu	CD2, CD13, CD22, CD24, CD27, CD44, CD58, CD64, CD65, CD117, CD79a, (i)IgM (μ-chain), CRLF2, NG2, κ-řetězec, λ-řetězec
Všechny linie	Obsah DNA

AIEOP-BFM		
Linie	**Pozitivní**	**Antigeny**
B-ALL	≥ 2	CD19, CD10, (i)CD22, iCD79a
T-ALL	všechny 3	(i)CD3, CD7, *slabě poz. nebo neg.* iMPO
AML	≥ 2	CD13, CD33, CD64, CD65, CD117, iMPO, nesplňuje B-ALL/T-ALL

Klasifikace B-ALL	
B-I (pro-B)	$CD10^{neg}$
B-II (common)	$CD10^{pos}$
B-III (pre-B)	$iIgM^{pos}$
B-IV (mature B)	κ- nebo λ-$řetězec^{pos}$

Jak poznat B-ALL?

✓ jedná se o dominantní populaci v KD

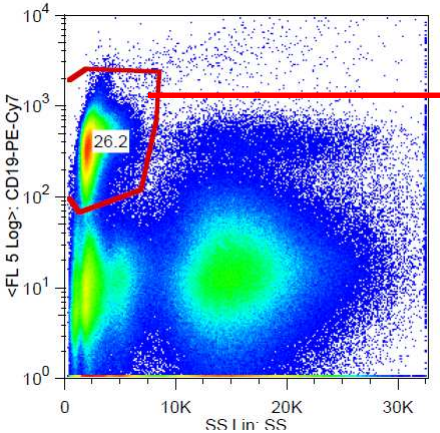
✓ rozdílný imunofenotyp atypických B buněk (LAIP):

- asynchronní exprese diferenciačních znaků
- exprese aberantních molekul – znaků fyziologicky přítomných u jiné hematopoetické řady nebo u jiného buněčného typu

✓ znalost nemaligní B lymfopoezy

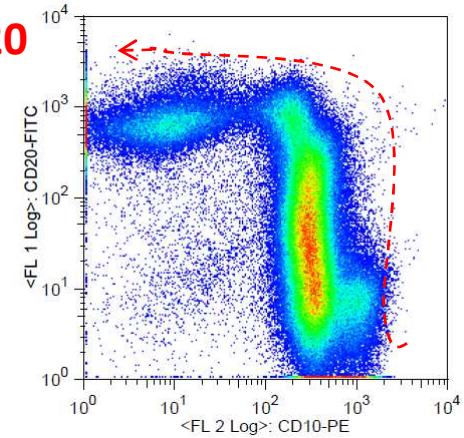
Máme 20/10..(19/34/45/38)!

26% CD19+ buněk v KD



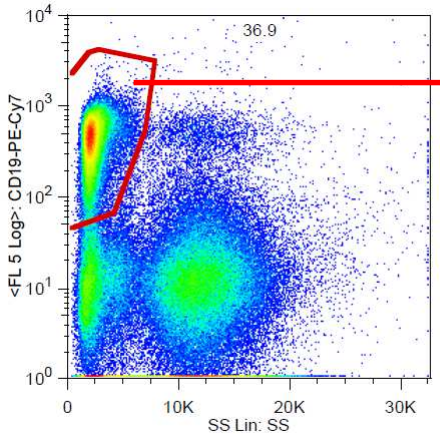
CD20

fyziologická diferenciace

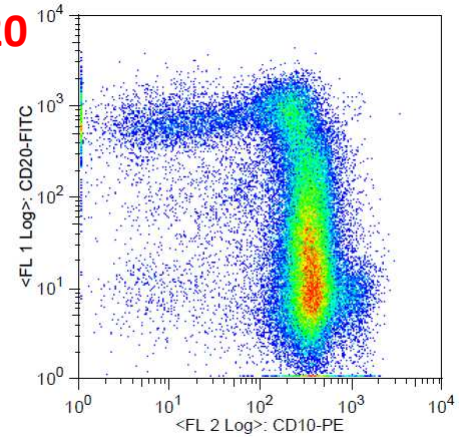


CD10

37% CD19+ buněk v KD!

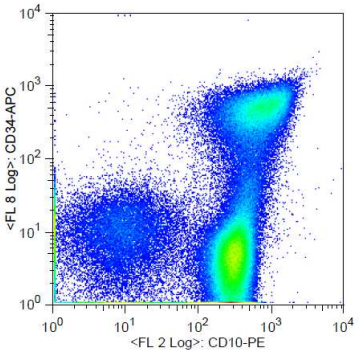


CD20

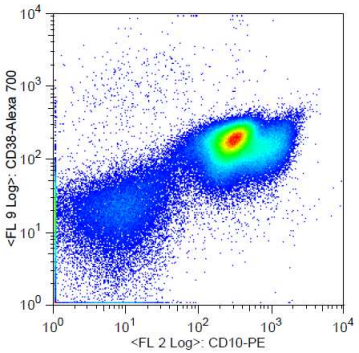


CD10

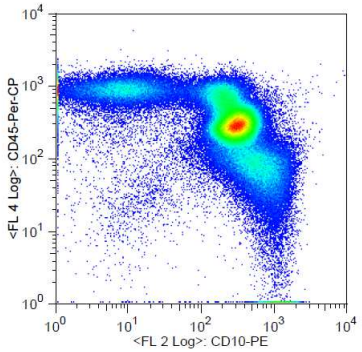
CD34



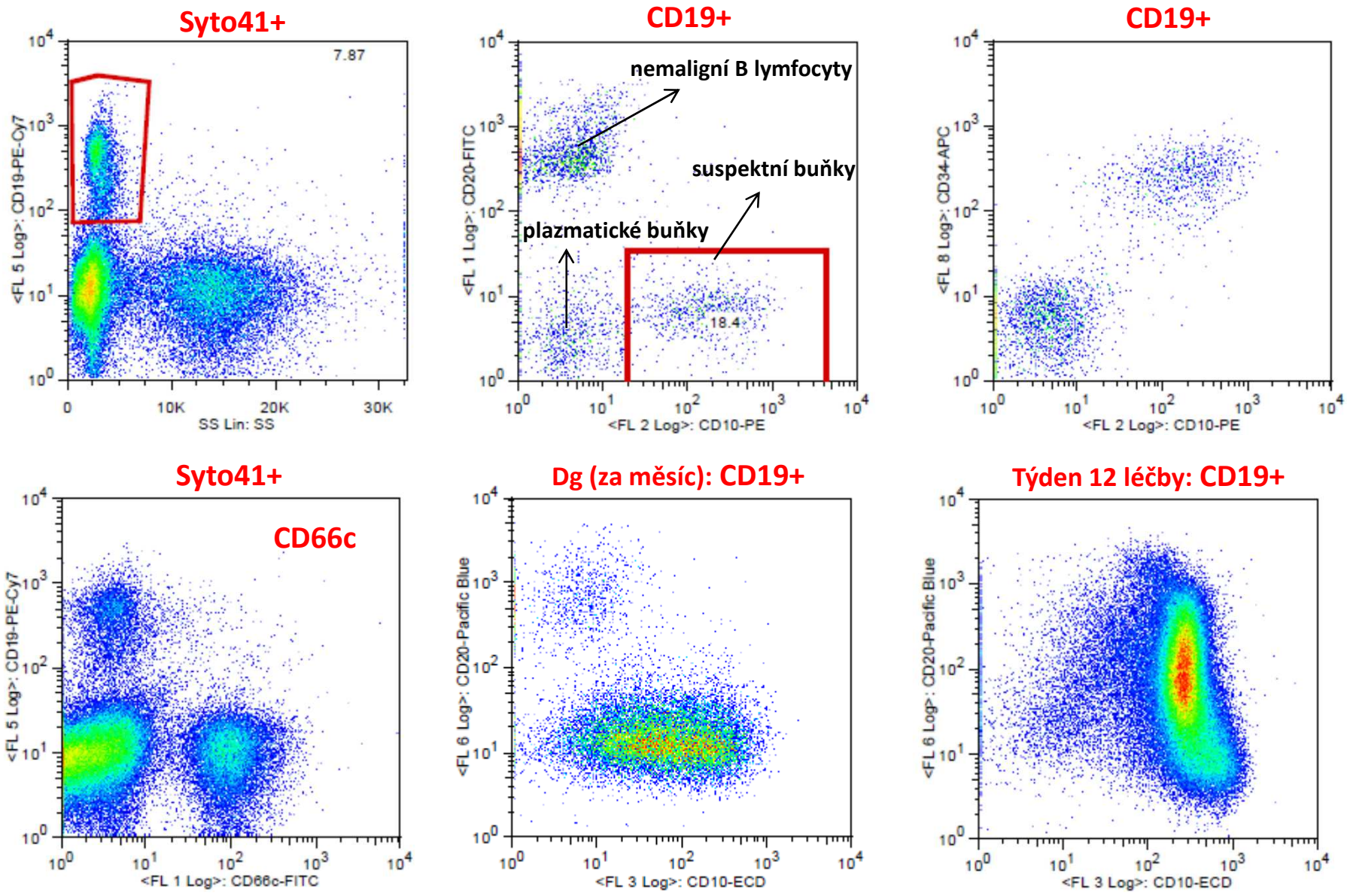
CD38



CD45

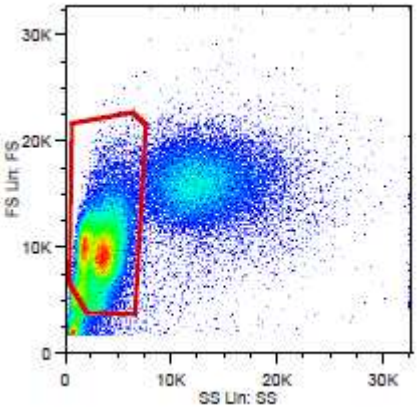


Váhavě nastupující leukémie

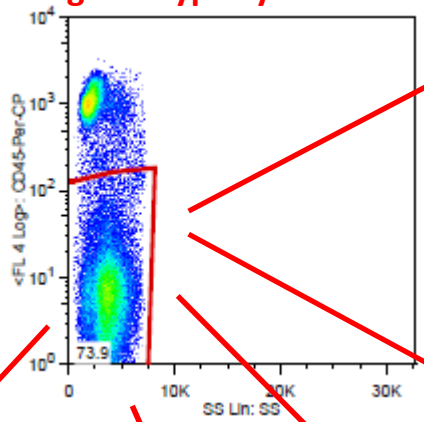


Analýza: gatovací strategie

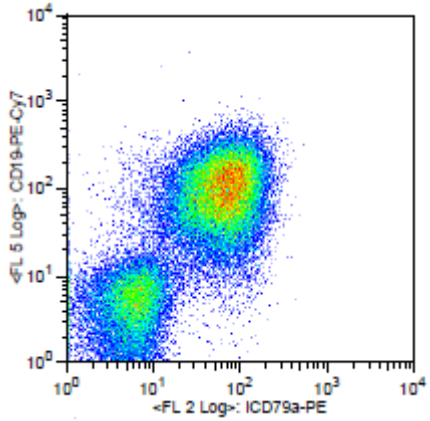
optický gate



gate atypických buněk

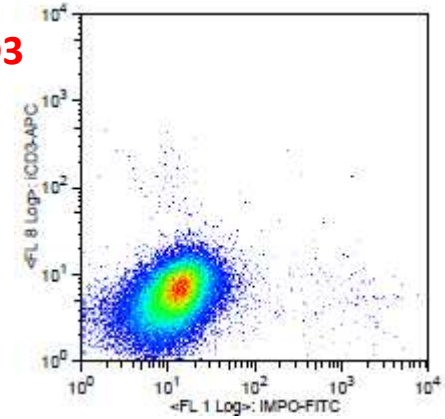


CD19



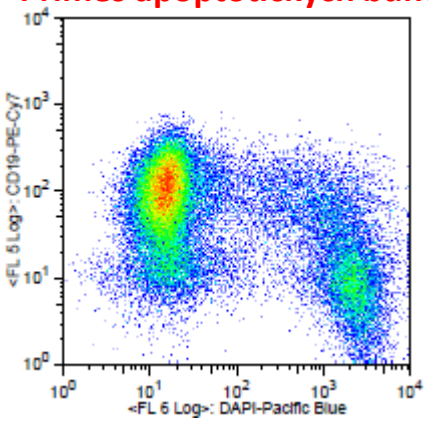
iCD79a

iCD3

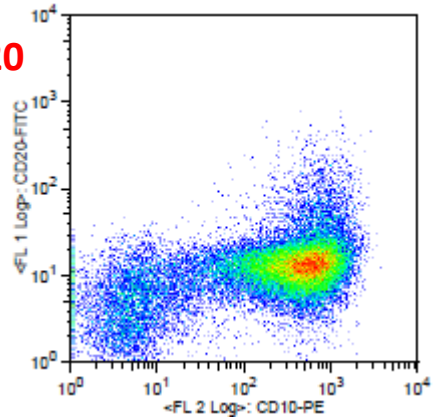


iMPO

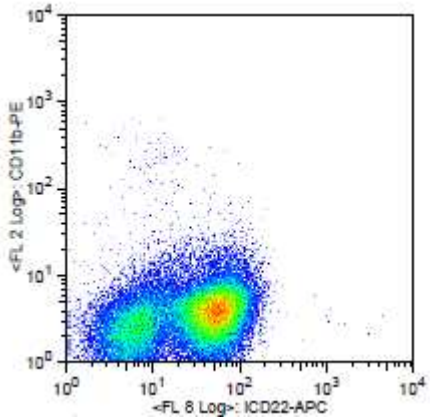
Příměs apoptotických buněk



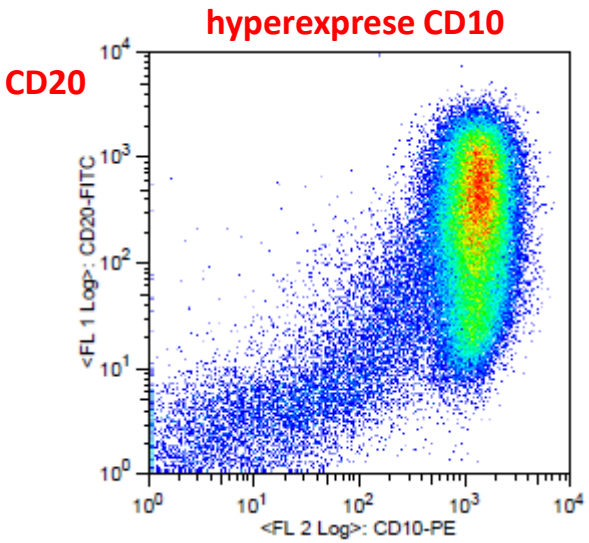
CD20

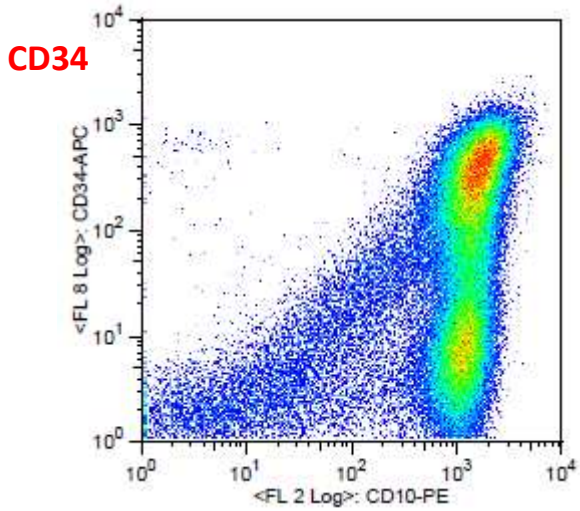


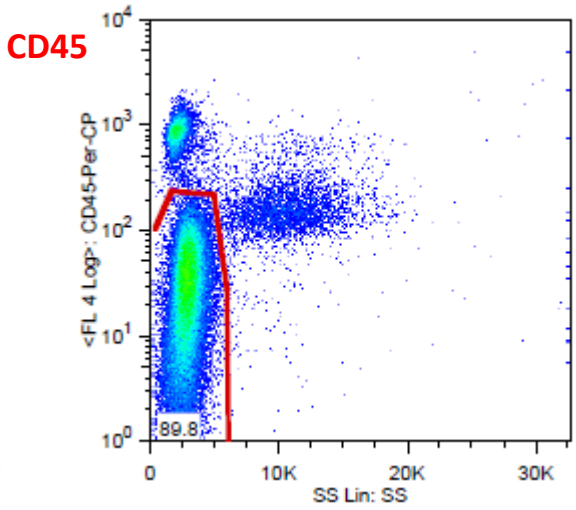
CD10

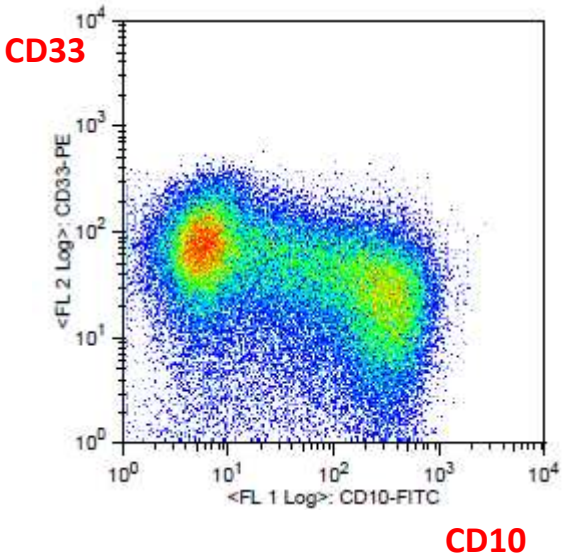


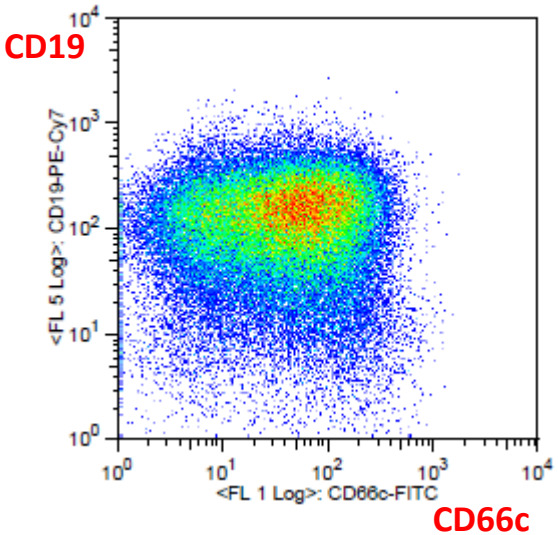
iCD22











exprese aberantních znaků

vybrané myeloidní znaky

↓

hybridní skóre

Table 3B. Definitions of MPAL.

Reference	Type of MPAL	Logical operators	Conditions to be fulfilled				
Borowitz *et al.* (WHO)	MPAL My/B	both:	My characteristics	B characteristics			
	MPAL My/T	both:	My characteristics	T characteristics			
	MPAL B/T	both:	B characteristics	T characteristics			
	B characteristics	CD19 at least weak and ≥2 of:	CD19^{strong}	*i*CD22^{strong}	CD79a^{strong}	CD10^{strong}	
	T characteristics	single criterion	*(i)*CD3^{pos}				
	My characteristics		MPO^{pos}				
		or ≥2 of:	NSE^{pos}	CD11c^{pos}	CD14^{pos}	CD64^{pos}	lysozyme^{pos}
Behm *et al.* (SJCRH)	MPAL My/B	both:	MPO^{pos}	CD22^{pos}			
		and ≥1 of:	CD19^{pos}	*i*CD79a^{pos}			
	MPAL My/T	both:	MPO^{pos}	*i*CD3^{pos}			
	MPAL B/T	must be fulfilled:	*i*CD3^{pos}				
		and iIgM or ≥2 of:	*i*IgM^{pos}	iCD79a^{pos}	CD22^{pos}		
Bene *et al.* (EGIL)	MPAL My/B	both:	B score >2	My score >2			
	MPAL My/T	both:	T score >2	My score >2			
	B score	2 points per antigen	*(i)*CD79a^{pos}	*i*IgM^{pos}	iCD22^{pos}		
		1 point per antigen	CD19^{pos}	CD10^{pos}	CD20^{pos}		
		0.5 points per antigen	iTdT^{pos}	CD24^{pos}			
	T score	2 points per antigen	*(i)*CD3^{pos}	TCRαβ^{pos}	TCRγδ^{pos}		
		1 point per antigen	CD2^{pos}	CD5^{pos}	CD8^{pos}	CD10^{pos}	
		0.5 points per antigen	iTdT^{pos}	CD7^{pos}	CD1a^{pos}		
	My score	2 points per antigen	*i*MPO^{pos}[a]				
		1 point per antigen	CD13^{pos}	CD33^{pos}	CD65^{pos}	CD117^{pos}[b]	
		0.5 points per antigen	CD14^{pos}	CD15^{pos}	CD64^{pos}		

Abbreviations are explained in Table 3A. [a]The original paper also suggested a provisional inclusion of lysozyme positivity with a score of 2.0 points – this proposal was not addressed in the subsequent publications of the EGIL group. Lysozyme was not considered in the presented study. [b]This is the updated weight of CD117, the original proposal suggested a lower score. References to Tables 3A and 3B: (12-18, 38, 39)

Mejstříková et al. Hematologica 2010

Jak reportujeme cytometrický nález

- Tradičně: Slovní komentář a procenta pozitivních buněk pro vyšetřené znaky (z gatu atypických buněk)
- K tomu nově: **FDE kód**

Hrusak O, Basso G, Ratei R, Gaipa G, Luria D, Mejstrıkova E, Karawajew L, Buldini B, Rozenthal E, Bourquin JP, Kalina T, Sartor M, Dworzak MN, on behalf of the AIEOP-BFM Flow Network. **Flow Diagnostics Essential Code**: A Simple and Brief Format for the Summary of Leukemia Phenotyping. Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 2014;86B:288–291.

Procento atypických buněk ve vzorku

Charakter exprese znaků: NEG (pod 10%)
WEAK (10-50%)
STRONG (nad 50 %)

Zařazení leukémie (pB-ALL B-I, B-II, B-III, B-IV)

VÝSLEDEK VYŠETŘENÍ PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ

Fakultní nemocnice v Motole
Laboratorní centrum Kliniky dětské hematologie a onkologie, 2.LF UK a FN Motol
Laboratorní centrum CLIP - Cytometrie
Vedoucí lékař Doc. MUDr. Ondřej Hrušák, Ph.D.
V Úvalu 84, Praha 5 – Motol, 150 06
Tel: +420224436477 (6413), fax: +420224436521
http://clip.lf2.cuni.cz

Jméno:
Příjmení:
Rodné číslo:
Pohlaví:

Datum odběru: 29.9.2017

Věk (r.) 3,08 **Materiál:** **kostní dřeň**

Pracoviště: Brno D-ONK-031J Požaduje: MUDr. Klára Vejmělková
Komentář: záchyt

Leukocyty: *10^9/L Lymfocyty: *10^9/L

Gate: atypické buňky 45dim až neg

%blastů	**85 %**
%granulocytů	**1,8 %**
%monocytů	**0,057 %**
%nemalignich lymfocytů	**6,2 %**
CD10	**93 %**
CD10++19+20neg+	**50 %**
CD115	**2 %**
CD116	**0,34 %**
CD117	**0,43 %**
CD11b	**2,4 %**
CD11c	**0,13 %**
CD13	**0,69 %**
CD14	**0,23 %**
CD15	**0,54 %**
CD19	**93 %**
CD2	**0,3 %**
CD20	**4,5 %**
CD200	**87 %**
CD22	**52 %**
CD24	**89 %**
CD27	**23 %**
CD3	**0,74 %**
CD33	**11 %**
CD34	**83 %**
CD38	**86 %**
CD4	**0,25 %**
CD44	**99 %**
CD45	**48 %**
CD45++	**0 %**
CD45dim	**48 %**
CD5	**0,47 %**
CD56	**0,44 %**
CD64	**0,24 %**
CD65	**0,75 %**
CD66c	**55 %**
CD7	**0,33 %**
CD72	**90 %**
CD79a	**1,1 %**
CD8	**0,33 %**
CD81	**90 %**

Intracelulární antigeny

iCD22	**98 %**
iCD3	**0,055 %**
iCD79a	**98 %**
iIgM	**0,55 %**
iLysozym	**0,09 %**
iMPO	**0,16 %**
iTdT	**98 %**

DNA analýza

% G0-1 aneuploidních klon 1	**81 %**
% G0-1 euploidních	**8,6 %**
DNA index klonu 1	**1,12**
Popis DNA	**Přítomen nízce hyperdiploidn i peak, SG2M=7,9%**

VÝSLEDEK VYŠETŘENÍ PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ

Fakultní nemocnice v Motole
Laboratorní centrum Kliniky dětské hematologie a onkologie, 2.LF UK a FN Motol
Laboratorní centrum CLIP - Cytometrie
Vedoucí lékař Doc. MUDr. Ondřej Hrušák, Ph.D.
V Úvalu 84, Praha 5 – Motol, 150 06
Tel: +420224436477 (6413), fax: +420224436521
http://clip.lf2.cuni.cz

Jméno:
Příjmení:
Rodné číslo:
Pohlaví:

Datum odběru: 29.9.2017

Věk (r.) 3,08 **Materiál:** **kostní dřeň**

CD84	**15 %**
CD99	**71 %**
CLL1	**0,6 %**
CRLF2	**1,7 %**
HLA DR	**95 %**
IgM	**2,4 %**
kapa	**2,3 %**
lambda	**0,39 %**
NG2	**0,95 %**
VNN2	**0,87 %**

FDE:85%; STRONG:CD10,19,i22,22,24,34,38,44,66c,72,i79a,81,99,200,HLA DR,iTdT, WEAK:CD27,33,84, NEGATIVE:CD2,3,i3,4,5,7,8,11b,11c,13,14,15,20,56,64,65,79a,115,116,117,CLL1,CRLF2,IgM,iIgM,iLysozym ,iMPO,kapa,lambda,NG2,VNN2; pB-ALL B-II.

Komentář a závěr

V kostní dřeni je přítomno 85% atypických buněk, dále 6,2% lymfocytů, 1,8% granulocytů a 7% nezařaditelných CD19negCD45neg buněk, v.s. apoptotických blastů.
Atypické buňky jsou CD10+ až ++.
Aberantní exprese CD66c na části a naznačená exprese CD33 na malé části blastů.

Z: Nizce hyperdiploidní cALL s aberantní expresí CD66c.
Dr.Vášková

RNDr. Martina Vášková, Ph.D.

---

datum, jméno a podpis odpovědné osoby
Pozn. Výsledek je neplatný bez podpisu.

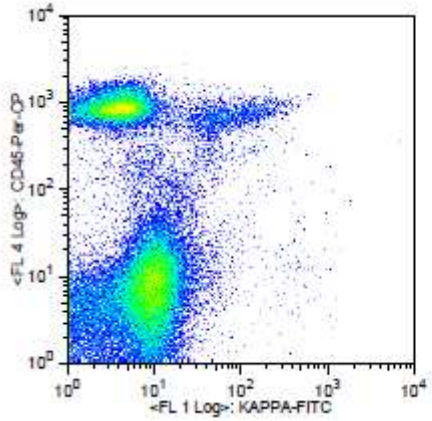
M 8276

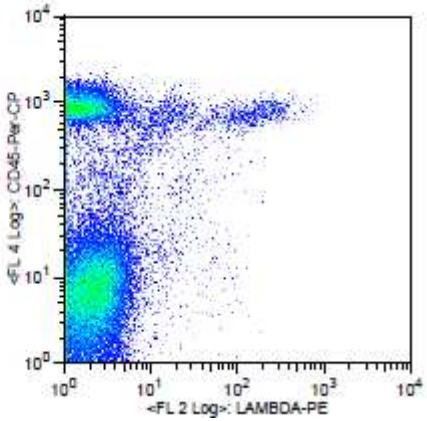
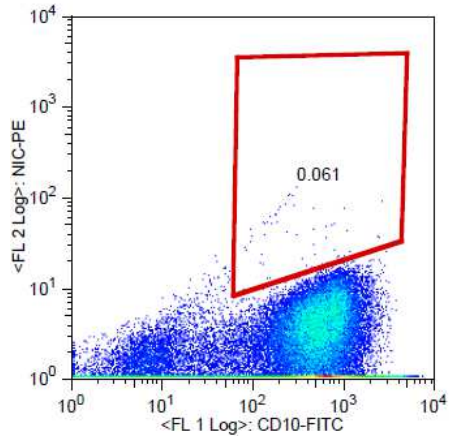
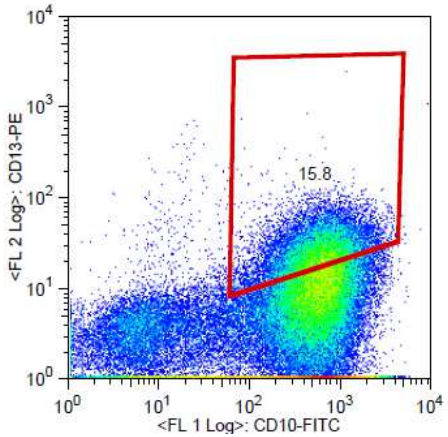
Datum zpracování: 29.9.2017 *Datum vydání výsledku: 2.10.2017*

Zdravotnická laboratoř akreditovaná ČIA dle ČSN EN ISO15189:2013 pod č.8276. Molekuly jsou vyšetřeny akreditovanými metodami dle SOPm_012 (Stanovení lymfocytárních subpopulací v per.k. průt.cytometrií), SOPm_013 (Imunofenotypizace průt. cytometrií); resp. SOPm_016 (Stanovení CD34+ buněk v kostní dřeni, per.krvi,pupečníkové krvi a aferézních produktech průt.cytometrií (ISHAGE)). Nejistoty měření jsou dostupné v laboratoři na požádání.

Kontroly značení

- Interní kontroly (nemalignní lymfocyty)





- FMO (Fluorescense Minus One)kontroly