

IX.

národní workshop

MNOHOČETNÝ MYELOM

a roční setkání České myelomové skupiny

Flowcytometrie u MG - zasedání pracovní skupiny

Lucie Kovářová a kol.

OKH, FN Brno

Program setkání

- 1) Využití flow cytometrie u MG
- 2) Zkušenosti jednotlivých center - zhodnocení dotazníku
- 3) Problematika nízce infiltrovaných vzorků (MGUS, AL amyloidóza apod.)
- 4) Výsledky analýz dle pracovišť
- 5) Diskuze a návrh jednotného postupu analýz

Průtoková cytometrie u MG I.

- nezbytná u vybraných hematol. malignit
 - ✓ diagnostika a sledování stavu onemocnění
- u MG neslouží ke stanovení dg.
 - ✓ omezení na výzkum a analýzu nejasných případů
- nesrovnalost s morfologickým hodnocením
 - ✓ podhodnocení počtu PC
- síla FC je v možnosti ověřit klonalitu!!!
 - ✓ zastoupení normálních N-PC a klonálních A-PC

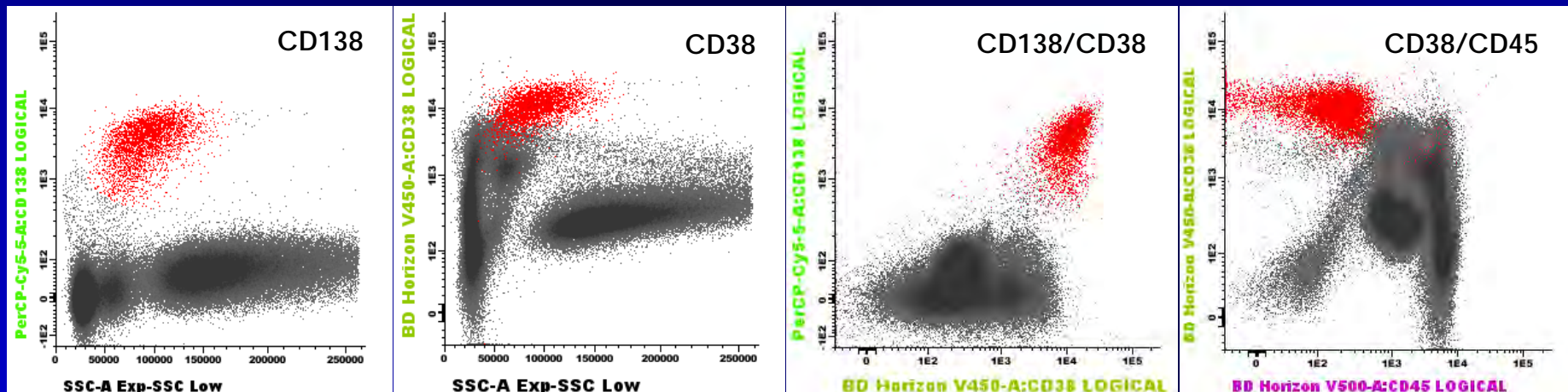
Průtoková cytometrie u MG II.

- **Diferenciální diagnostika**
 - ✓ odlišení a klasifikace onemocnění z PC
- **Identifikace skupiny asymptomatických MG s vysokým rizikem progresu do MM**
 - ✓ možnost identifikace pacientů, kteří by profitovali z dřívějšího zahájení léčby
- **Analýza minimální reziduální choroby**
 - ✓ potvrzení stringent complete response

Rawstron et al., 2008; Paiva et al., 2010

Imunofenotypizace

- CD38/CD138 - jednoznačná identifikace PC v KD
(v PK spíše plazmablasty CD138⁻/dim⁺)
- CD45 - informativní charakter



Stanovení počtu PC

▪ Důvody podhodnocení

- zředění KD v důsledku odběru dalších ml
- analýza suspenze ochuzené o PC asociované s lipidovými fragmenty

▪ Při porovnání s morfologií

- ✓ senzitivita obou přístupů je shodná
- ✓ výsledky (% infiltrace PC) spolu korelují
- ✓ FC stanovení % PC je nezávislý prognostický faktor s dopadem na celkové přežití pacientů

Nadav et al., 2006; Paiva et al., 2009a

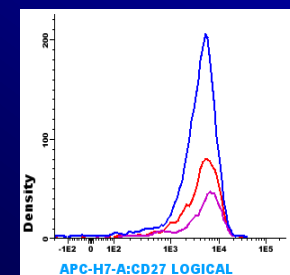
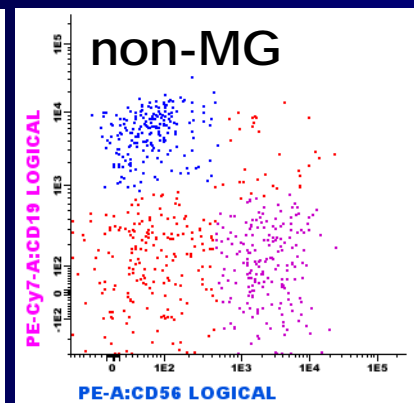
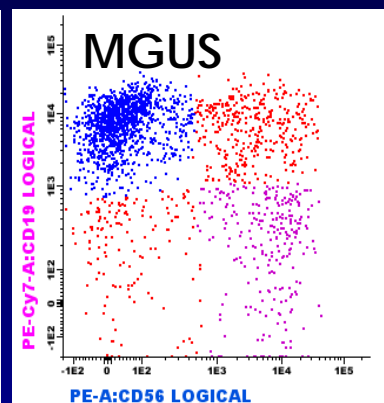
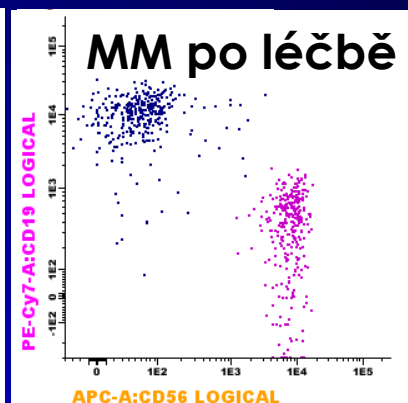
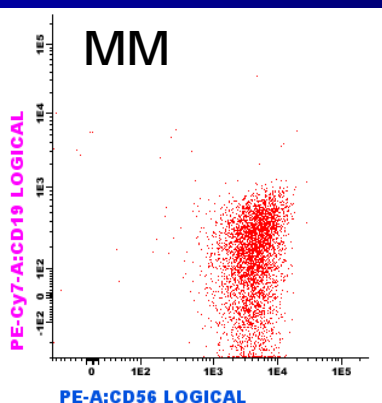
Stanovení klonality PC

- základní 4-barevná analýza (N-PC/A-PC)

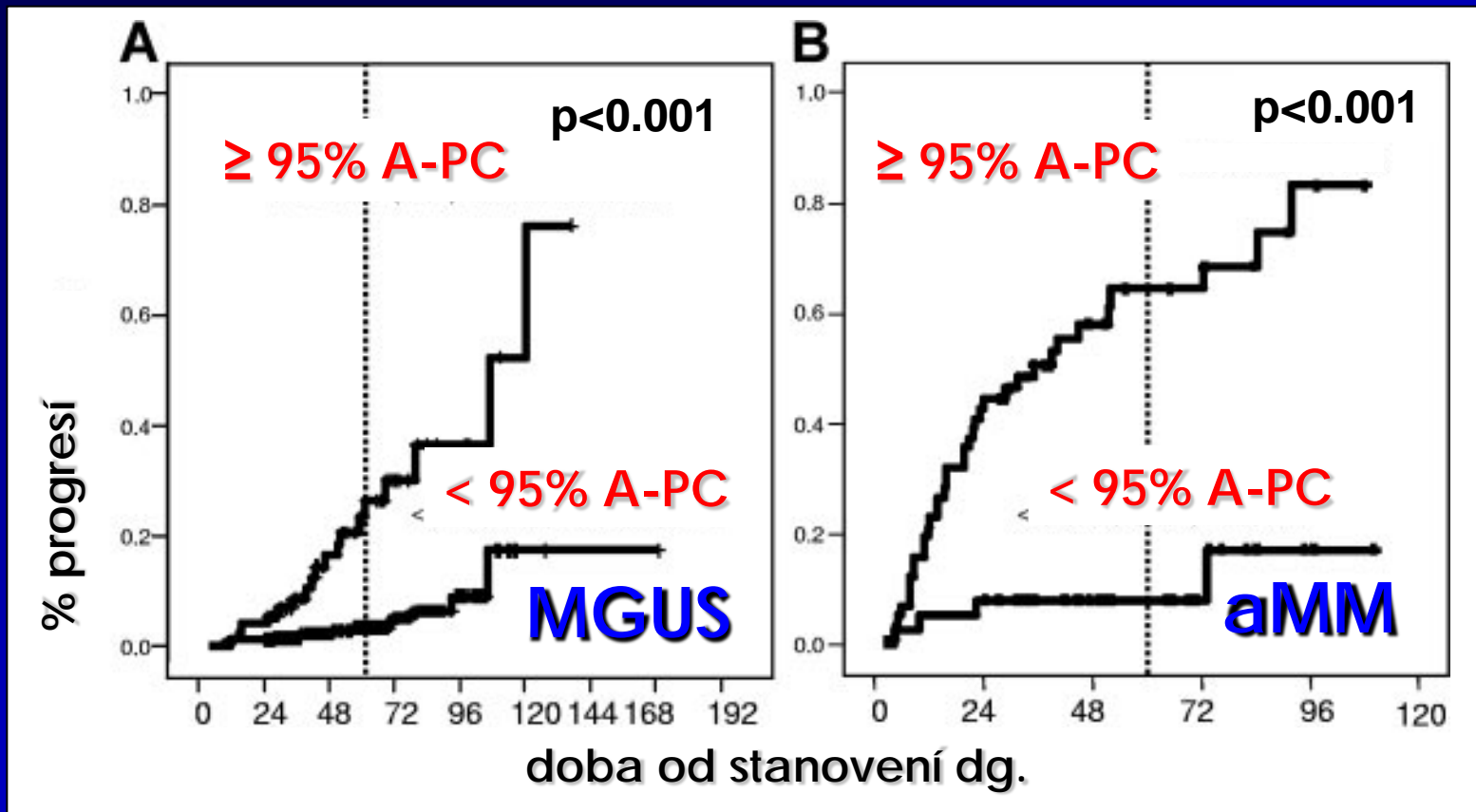
- ➔ CD38/CD138/CD19/CD56

- ✓ CD19 - marker B lymfocytů a fyziologických PC

- ✓ CD56 - znak klonálních PC

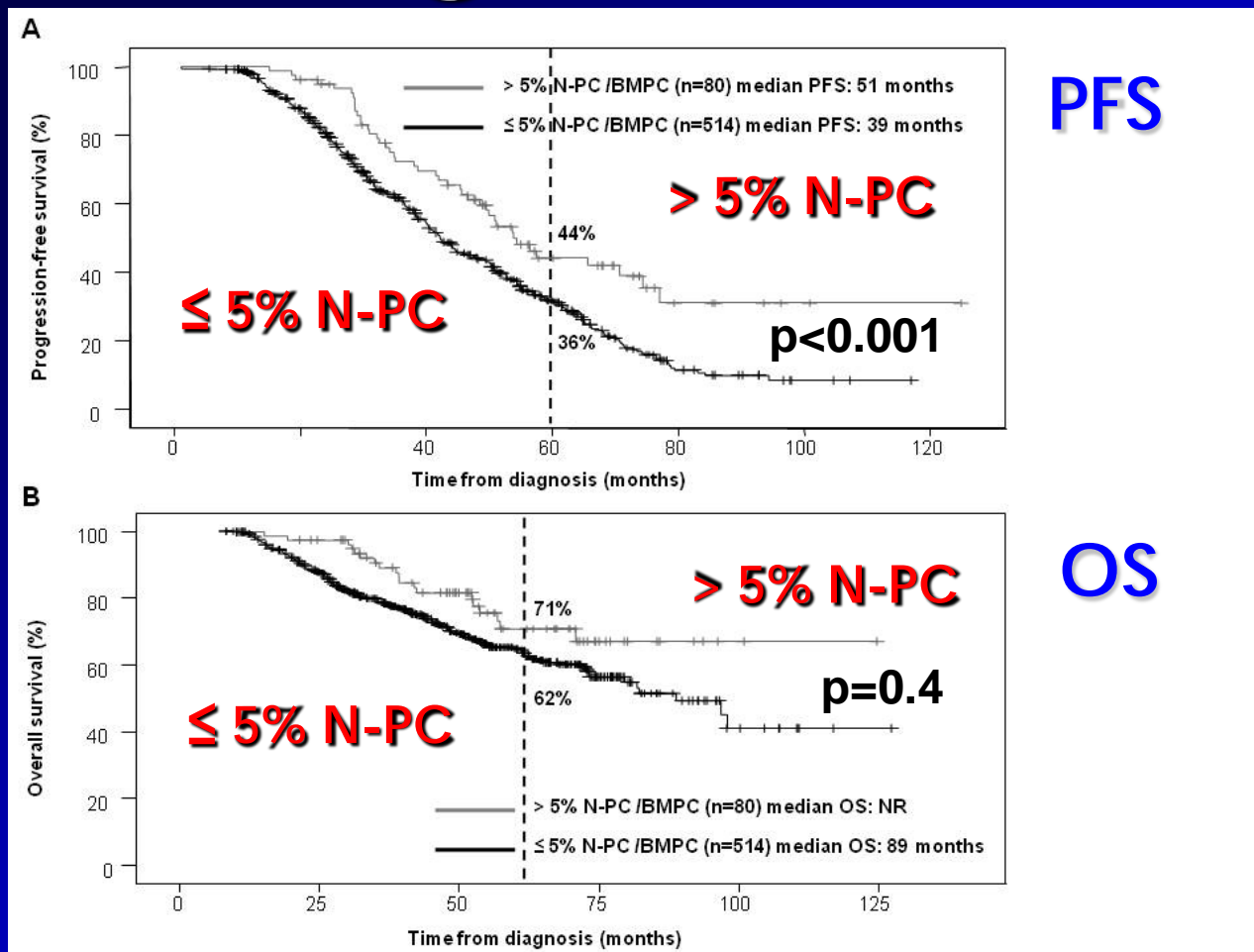


Predikce progrese MG



Peréz-Persona et al., 2007; Peréz-Persona et al., 2009

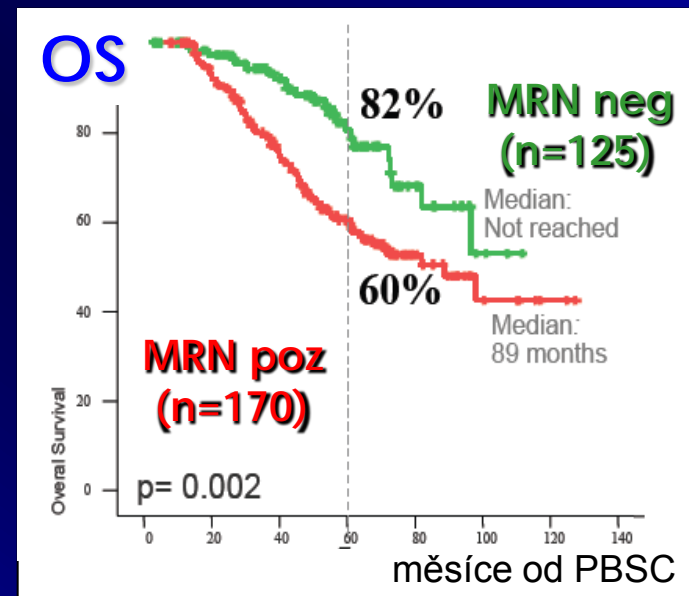
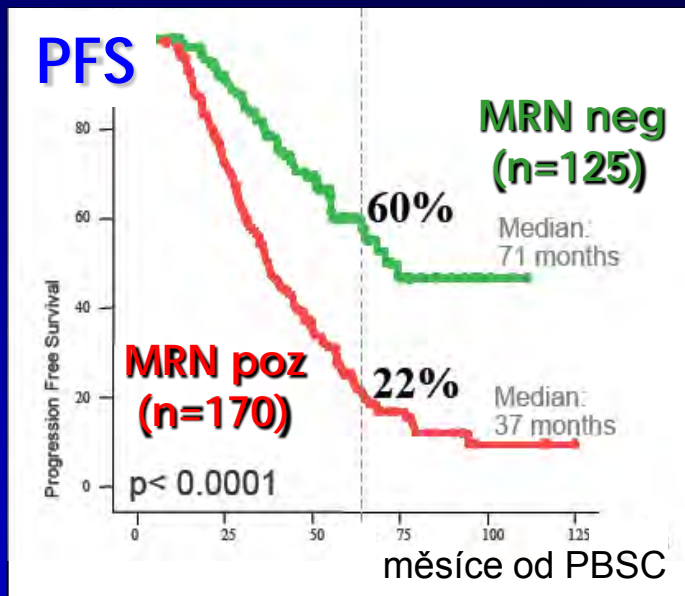
Prognóza MM



Paiva et al., 2009b

FC stanovení MRN

- ✓ kritérium pro sCR (žádná A-PC ze 3000 PC)
- ✓ aplikovatelnost na většinu pacientů
- ✓ citlivost 10^{-4}



Paiva et al., 2008; Rajkumar et al., 2011

Další aplikace

- **Prognostický význam imunofenotypizace**
 - ✓ souvislost fenotypu s cytogenetickými nálezy
 - ✓ **současná analýza CD28 a CD117 - 3 rizikové skupiny s rozdílným PFS**
 - ✓ **možnost identifikace vysoce rizikových pacientů se zkráceným přežíváním**
- **Identifikace nových terapeutických cílů**

Panel - FN Brno

- **klonalita**, **adhezivní molekuly**, **nové markery**
prognostické markery, **subpopulace B ly apod.**

Tube	BD Horizon V450	BD Horizon V500	FITC	PE	PerCP- Cy5.5	PC7	APC	APC-H7
1	CD38	CD45	CD20	CD56	CD138	CD19	CD117	CD27
2	CD38	CD45	CD33	FGFR3	CD138	CD19	CD28	CD27
3	CD38	CD45	CD54	CD40	CD138	CD19	CD56	CD44
4	CD38	CD45	slgD	CD24	CD20* CD138	CD19	slgM	CD27
5	CD38	CD45	ckappa	clambda	CD138	CD19	CD56	CD27
6	CD38	CD45	CD20	CD56	CD138	CD19	cnestin	CD27

* PerCP

EMN standardizace I.

▪ European Myeloma Network (EMN) - 2003

- ✓ integrace laboratorního výzkumu a zvyšování účinnosti terapie u MM a souvisejících nemocí
 - studium mechanismu a patogeneze onemocnění
 - hledání nových prognostických faktorů a monitorování onemocnění
 - vývoj terapeutických a metodologických přístupů
- ✓ standardizační workshopy (FC, FISH aj.)
 - nalezení shody a vytvoření doporučení pro analýzy
 - 3 flowcytometrické již proběhly, čeká se na výstupy

EMN standardizace II.

- **morfologické hodnocení - kvalita vzorku**
 - ✓ pouze pro analýzu MRN - nutná přítomnost normální erytroidní, myeloidní či lymfoidní progenitorové řady
- **diferenciální dignostika dle přítomnosti A-PC**
 - ✓ Rozdíl mezi MGUS, MM a reaktivními podmínkami
- **monitorování MRN a léčebné odpovědi**
 - ✓ spíše detekce fenotypově abnormálních bb než c κ / λ
 - ✓ The EMN-02 Intergroup Trial - analýza odpovědi v průběhu různých stádií léčby (standardizovaný postup analýz)

Rawstron et al., 2008

EMN standardizace III.

- **příprava vzorku**
 - ✓ lýza erytrocytů bez fixace (nyní již může být i fixace)
 - ✓ PC gate CD38 vs. CD138 (bez kontroly gateování)
- **počet PC**
 - ✓ minimálně 100 neoplastických PC
 - ✓ pro citlivost 0,01% nutno analyzovat 10^6 bb
 - ✓ možnost spojování zkumavek (merge)
- **analýza markerů s prediktivně-prognostickou hodnotou**
 - ✓ nezbytné - CD38/CD138/CD19/CD56
 - ✓ doporučené - CD20, CD27, CD28, CD117
 - ✓ volitelné - CD81, CD200...

Rawstron et al., 2008

EMN standardizace IV.

Minimalistická FC analýza (4-barevná):

1. identifikace CD38⁺CD138⁺ PC
2. odlišení CD19⁺ N-PC od CD19⁻ (CD56^{+/-}) A-PC

8 (6) barevná analýza dle protokolu Euroflow s využitím SW Infinicyt (Cytognos):

PB	PO	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
CD45	CD138	CD38	CD56	β_2m	CD19	clg κ	clg λ
CD45	CD138	CD38	CD28	CD27	CD19	CD117	CD81

Rawstron et al. Haematologica 2008, van Dongen et al. Leukemia-in print 2010

Vyhodnocení dotazníků

- osloveni členové CMG, studioví partneři a spolupracující laboratoře flow cytometrie
- rozeslán dotazník se základními dotazy stran vybavení a zpracování vzorku
- cílem je sjednocení metodik a standardizace postupů v rámci ČR v návaznosti na EMN s publikací v českém periodiku

Pracoviště

▪ Počet zúčastněných pracovišť - 14 (12)

- ✓ OKI, Nemocnice, ČB
- ✓ KNTB, Zlín
- ✓ LPC, ÚHKT, Praha
- ✓ OKH, FN Brno
- ✓ Spadia Lab, OV
- ✓ OKH, NsP, Havířov
- ✓ ÚPMM, FN Motol
- ✓ OKH, FNKV, Praha
- ✓ ÚKIA, HK
- ✓ Imalab s.r.o., Zlín
- ✓ OHT, Pelhřimov
- ✓ HOK, FN Olomouc
- ✓ KOC, Nový Jičín
- ✓ IHOK, FN Brno

Výsledky I.

- **Typy přístrojů**
 - 1-2 lasery (4 PMT) - 3 pracoviště (2xBC, 1x BD)
 - 1-2 lasery (5 PMT) - 4 pracoviště (BC)
 - 2 lasery (6 PMT) - 2 pracoviště (BD)
 - 3 lasery (8 PMT) - 5 pracoviště (4xBD+1xBC)
- **Provádění IFT u MG**
 - 10x vždy vs. 8x u nejasností
- **Zpracování vzorku**
 - 11x lýza vzorku KD vs. 1x separace MNC

Výsledky II.

- **časování analýz**
 - ✓ všichni u nových dg.
 - ✓ 2x ne u MRN
 - ✓ 1x ne u PG/R
- **analyzované znaky**
 - ✓ všichni CD38/CD138 s CD19/CD56
 - ✓ 7x analýza také jiných markerů
 - ✓ 6x analýza klonality
- **postupy dle doporučení - vesměs EMN**

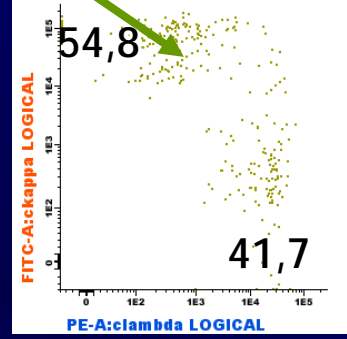
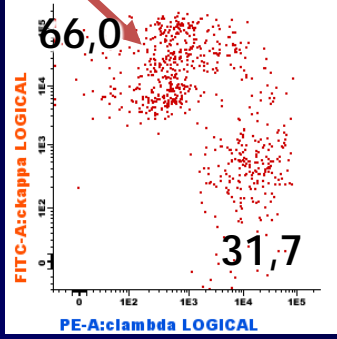
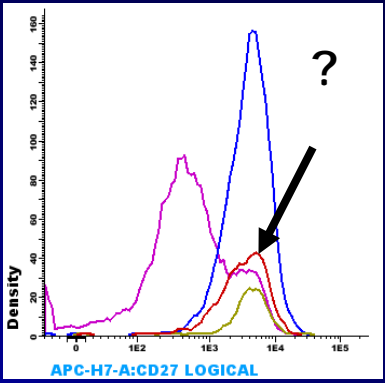
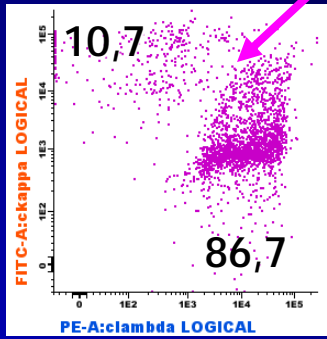
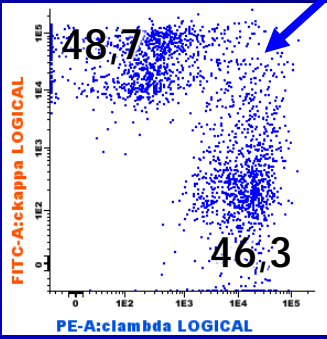
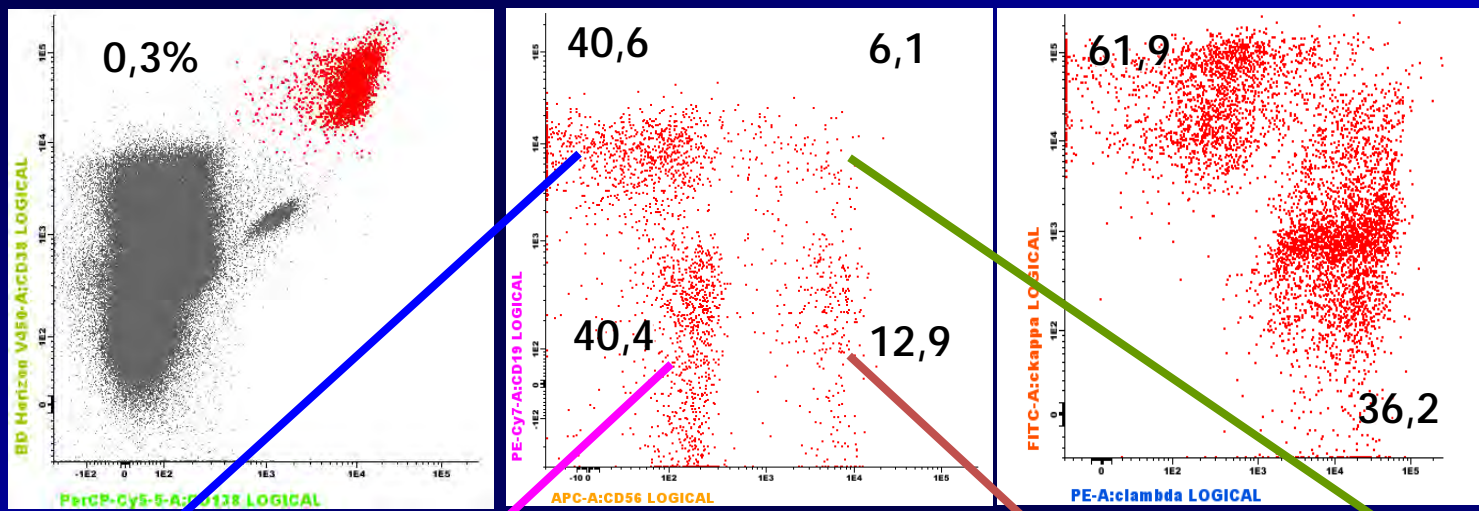
Nízce infiltrované vzorky I.

- **Výzkumný program zaměřený na MG**
 - ✓ RMG registr - evidence a centralizace MG
 - otevřený projekt - možnost spolupráce
 - ✓ **identifikace vysoce rizikové skupiny pacientů s MGUS či aMM, která časně zprogreduje do symptomatického MM**
 - retrospektivní analýza známých rizikových faktorů
 - hledání nových potenciálních prediktivních faktorů
 - ✓ **individuální léčebný přístup**

Nízce infiltrované vzorky II.

- **Přístup k analýze nových faktorů**
 - ✓ flow cytometrické stanovení klonality PC
 - ✓ sortování buněk pro cytogenetické a další molekulárně-biologické metody
- **Možnost transportu vzorku do Brna**
 - ✓ vyšetření nejnovějšími metodami
 - ✓ s většinou pracovišť nastaveno schéma odběrů

AL amyloidóza



Diskuze a návrh jednotného postupu analýz aneb „Standardizace v ČR“

- kolik fluorescencí a kolik markerů?
- nezbytnost shodných fluorochromů?
- kolik PC sbírat jako minimum?
- zavést referenční vzorek?
 - nativní či fixovaný?
- publikace.....

Stanovení klonality PC

- 4-barevná analýza

⇒ CD38/CD138/CD19/CD56

- 5-barevná analýza

⇒ CD38/CD138/CD19/CD56/CD45

- 6-barevná analýza

⇒ CD38/CD138/CD19/CD56/c κ /c λ

- 7-barevná analýza

⇒ CD38/CD138/CD19/CD56/c κ /c λ /CD45

- 8-barevná analýza

⇒ CD38/CD138/CD19/CD56/c κ /c λ /CD45/CD27

c κ /c λ /CD45/CD38/CD19
c κ /c λ /CD19/CD138/CD38



Euroflow



Seskupení expertů z oblasti průtokové cytometrie a molekulární diagnostiky

✓ 8 diagnosticko-výzkumných skupin

✓ 2 komerční subjekty

- nové protilátky

- nové imunobarvicí techniky a protokoly

- nový software pro analýzu dat