



**Leukemie/lymfoom diagnostiek:
Een scoresysteem gebaseerd
op een gestandaardiseerde bepaling?**

Frank Preijers, UMC St Radboud, Nijmegen

Harmonisatie in de Immuunfenotypering

1. Het overeen doen stemmen
2. Integratie
3. Standaardisatie



SIHON: 25 jaar leukemie / lymfoom diagnostiek EQA



Donnerdag 24 en vrijdag 25
november 2011
Engels, Groothandelsgebouw
Stationsplein 45, Rotterdam

**CYTOMETRIE
EN KWALITEIT
SIHON
25 JAAR**

JUBILEUMCONGRES VOOR
EXTERNE KWALITEITSBEWAKING
EN TOEKOMSTPERSPECTIEVEN
IN DE FLOWCYTOMETRIE

- NEDERLANDSE VERENIGING
VOOR CYTOMETRIE
- SKML SECTIE ICD

NVC
CYTOMETRIE.NL
NEDERLANDSE VERENIGING
VOOR CYTOMETRIE

sihon

skml
Sectie ICD, Cellanalyse

IFT

- Zeer veel parameters
- Grote dynamiek

Wat zijn de
verbeteringen in 25 jaar
EQA in IFT?

Coulter EPICS XL 3-color



New generation flow cytometers

BC Cyan ADP: 9-colors



- BD Canto II (8-colors)
- BC Cyan (9-colors)
- BC NAVIOS (diagnostic)/GALLIOS (RUO) (10-colors)

BC NAVIOS: 10-colors



BD Canto II: 8-colors

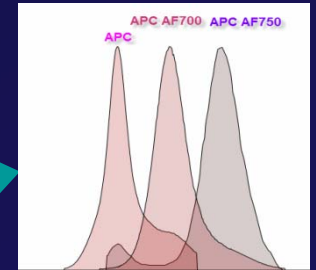




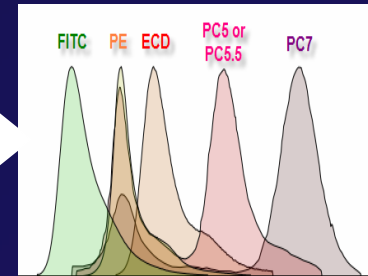
- NAVIOS/GALLIOS
- 3 lasers
- 10-colors



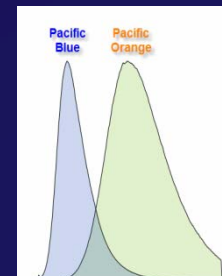
638nm



488nm



405nm



Instrument set up & compensation

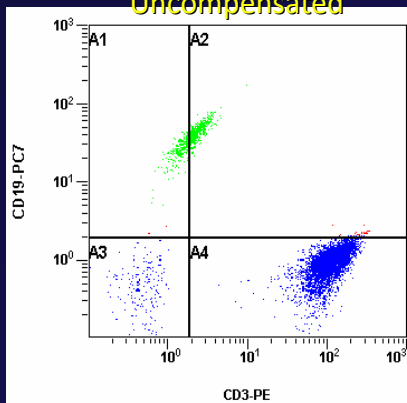
Cytometer Settings

	Label	Discr.	Volts	Gain
FS	FS	100	250	1.0
SS	SS	OFF	250	1.0
FL1	FITC	OFF	250	1.0
FL2	PE	OFF	250	1.0
FL3	ECD	OFF	250	1.0
FL4	PC5.5	OFF	250	1.0
FL5	PC7	OFF	250	1.0
FL6	APC	OFF	250	1.0
FL7	APCA700	OFF	250	1.0
FL8	APCA750	OFF	250	1.0
FL9	PacBlue	OFF	250	1.0
FL10	FL10	OFF	250	1.0

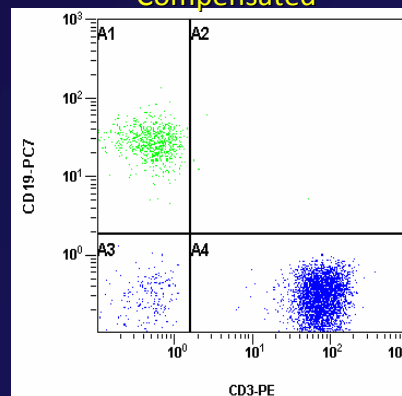
Compensation matrix

	FL 1	FL 2	FL 3	FL 4	FL 5	FL 6	FL 7	FL 8	FL 9	FL 10
FL 2	19.6		7.9	0.0	6.1	0.2	0.3	0.3	0.8	0.3
FL 3	15.4	46.6		0.0	2.5	0.2	0.3	0.2	0.0	0.0
FL 4	0.0	0.0	0.0		1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FL 5	1.1	3.2	10.8	21.2		0.3	0.7	1.1	0.0	0.0
FL 6	2.1	1.0	5.0	1.9	2.4		2.4	27.8	0.0	0.0
FL 7	0.6	0.3	1.3	2.1	1.0	10.4		20.8	0.7	0.0
FL 8	0.5	0.2	1.0	6.5	8.2	3.1	23.9		0.8	0.0
FL 9	0.9	0.3	1.7	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0		7.9
FL 10	5.9	1.4	1.8	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	10.7	

Uncompensated



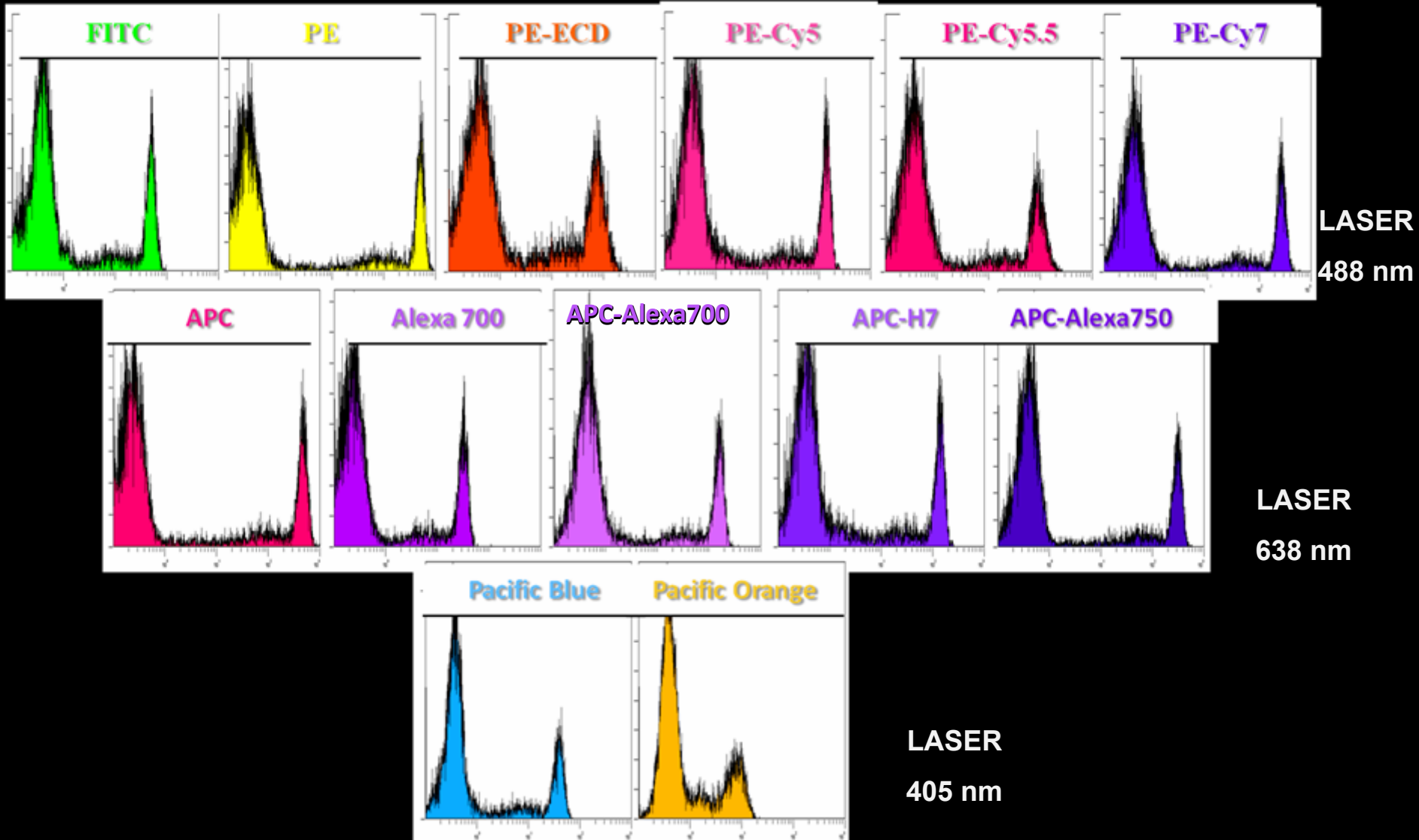
Compensated



1. Single color testing
2. Testing multicolor combination

Fluorochromes available for 10-colour

Bright fluorochromes: to detect weak antigens

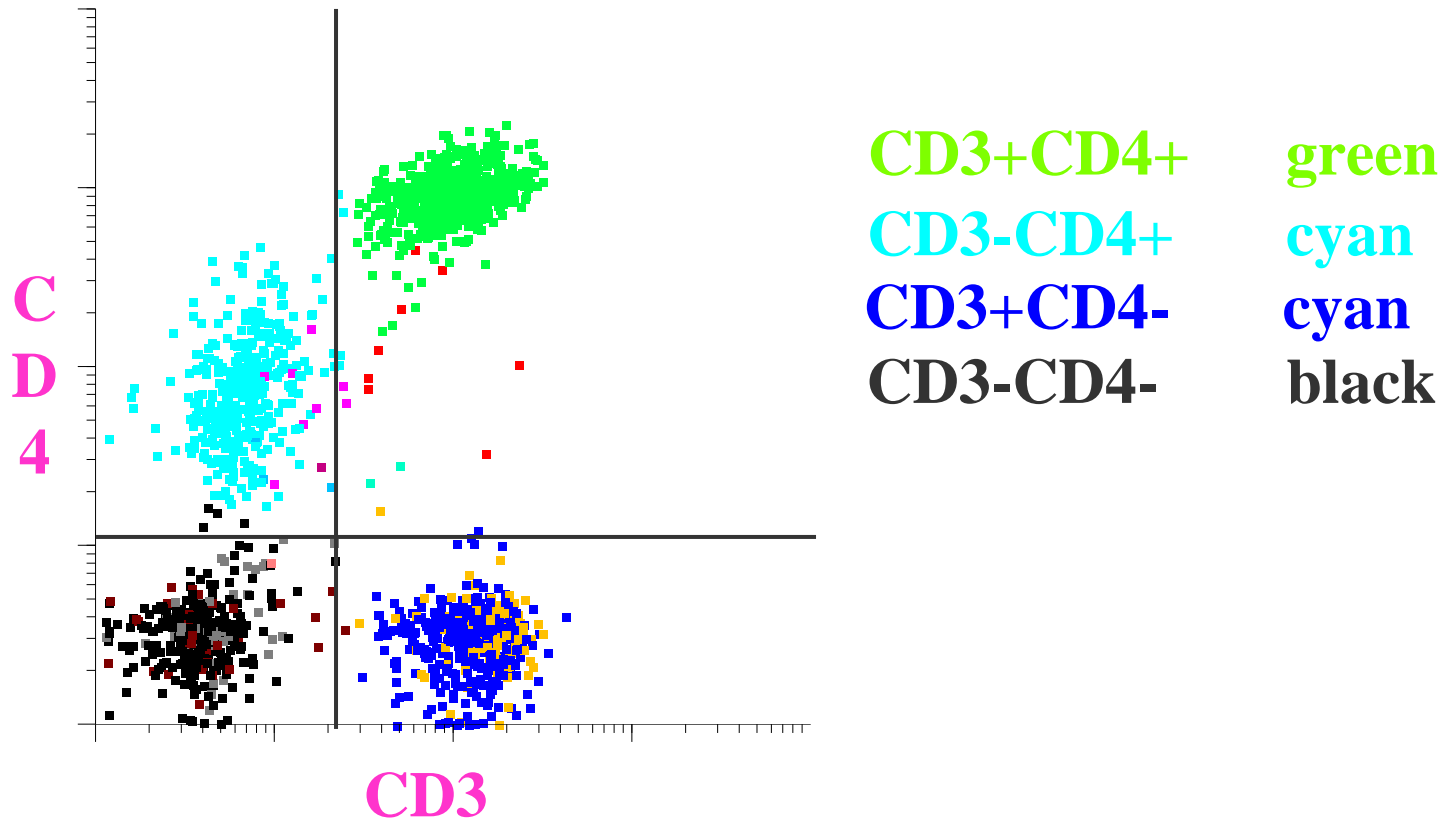


Monoclonal antibodies

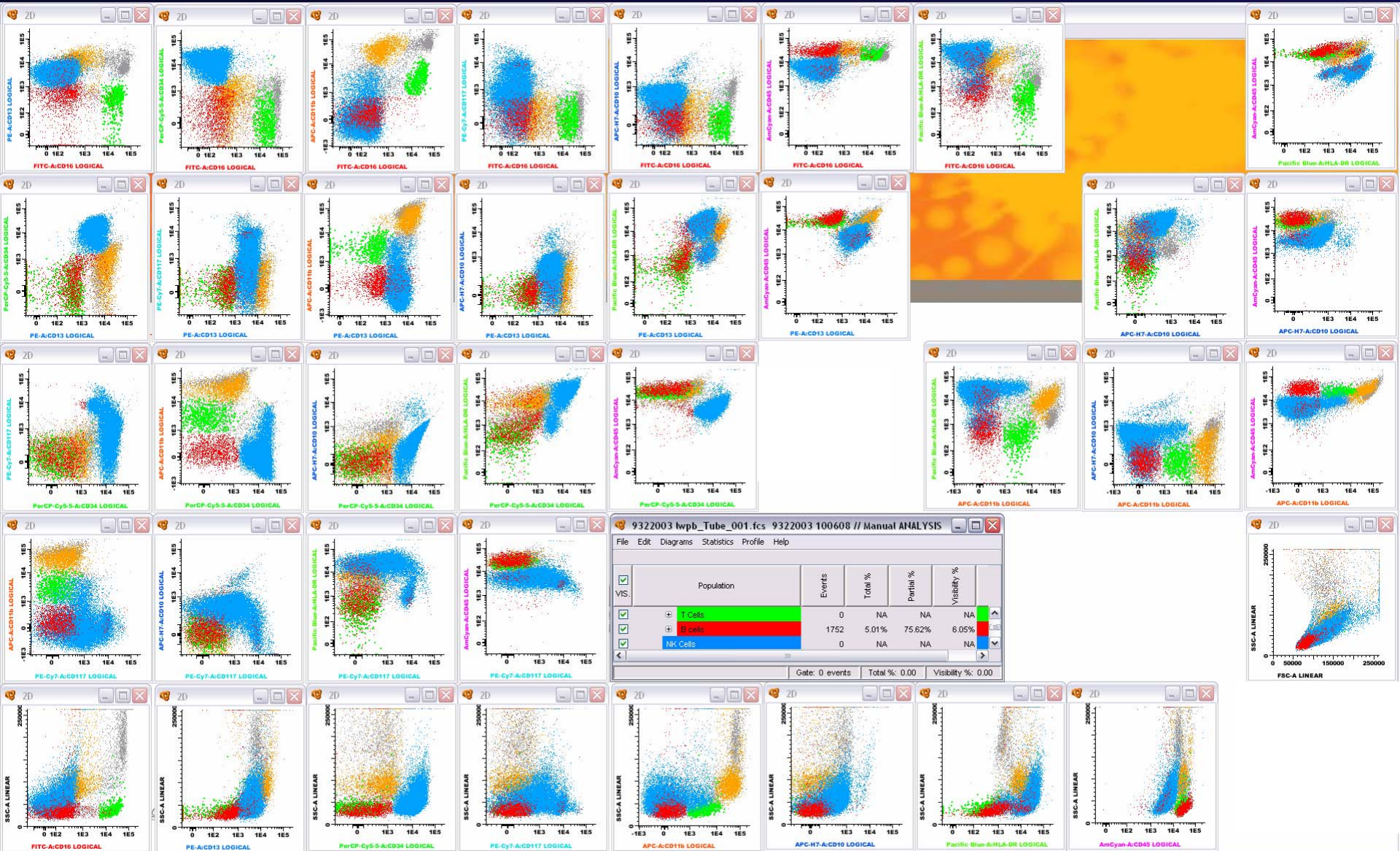
"Leucocyte Typing Workshop"

<u>Workshops</u>		<u>Number of MoAb</u>	<u>CD-codes determined</u>
<u>I</u>	<u>Parijs, 1982</u>	<u>±150</u>	<u>CD1-CDw15</u>
<u>II</u>	<u>Boston, 1984</u>	<u>±350</u>	<u>CD16-CDw26</u>
<u>III</u>	<u>Oxford, 1986</u>	<u>±900</u>	<u>CD27-CD45</u>
<u>IV</u>	<u>Wenen, 1989</u>	<u>±1100</u>	<u>CD46-CDw78</u>
<u>V</u>	<u>Boston, 1993</u>	<u>±1450</u>	<u>CD79-CDw130</u>
<u>VI</u>	<u>Kobe, 1996</u>	<u>±1150</u>	<u>CD131-CD166</u>
<u>VII</u>	<u>Harrogate, 2000</u>	<u>±270</u>	<u>CD167a-CD247</u>
<u>VIII</u>	<u>Adelaide 2004</u>	<u>±100</u>	<u>CD248-CD339</u>
<u>IX</u>	<u>Barcelona 2010</u>	<u>???</u>	<u>CD339-CD363</u>

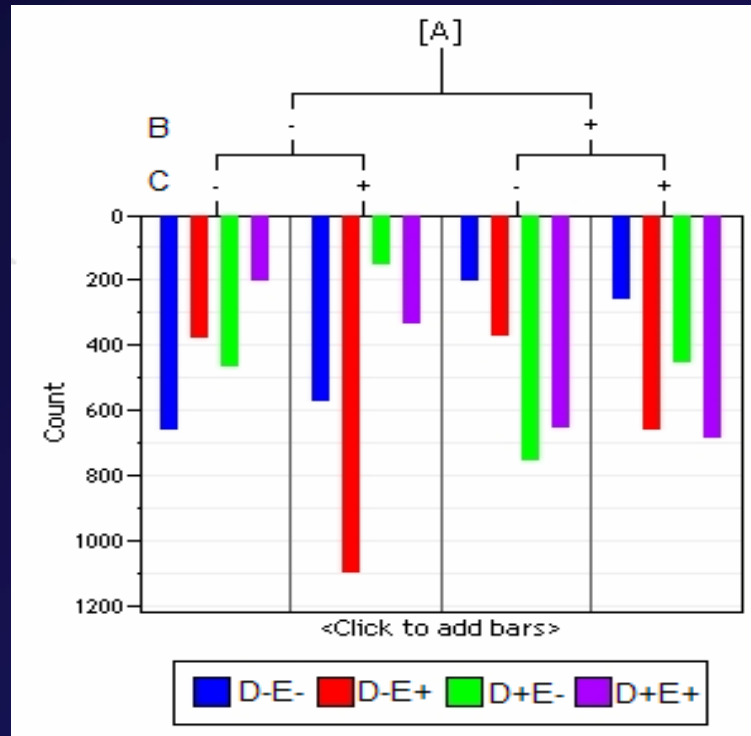
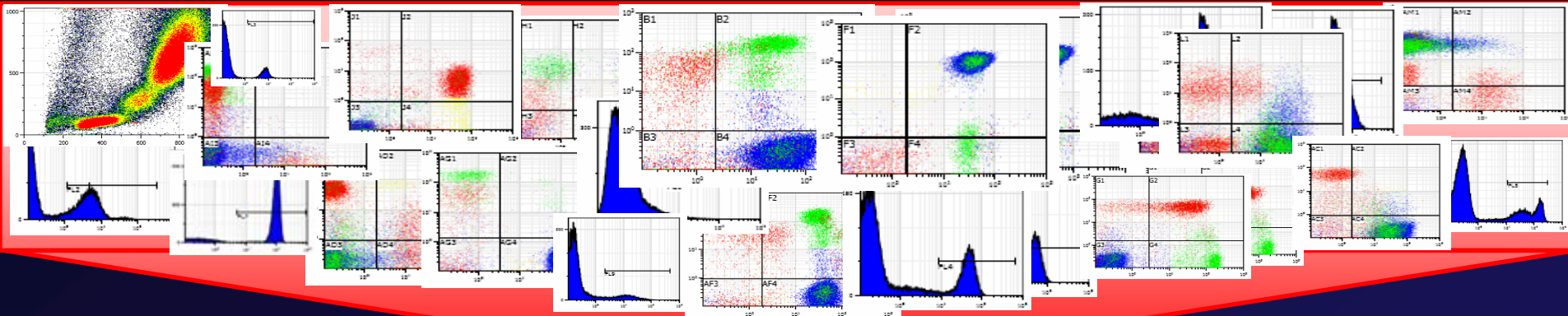
Patronen van Cel Clusters



Analyse of data – 8/10 colours



Reduce hundreds of plots into one with the tree plot



4-colour panel for leukemia screening

1	CD34	CD117	CD45	CD13.33
2	CD15	CD36	CD45	CD14
3	CD10	CD20	CD45	CD19
4	Smlgk	Smlgλ	CD45	CD19
5	HLA-DR	CD19	CD45	CD38
6	CD5	CD16,56	CD45	CD3
7	CD2	CD7	CD45	CD3
8	CD3	CD8	CD45	CD4

34 MoAbs

10-colour panel for leukemia screening

FITC	PE	ECD	PECy5.5	PECy7	Pac. Blue	Krome O.	APC	APC-Afl 700	APCAfl 750
CD34	CD7	HLA-DR	CD2	CD117	CD4	CD45	CD56	CD8	CD3
Igkappa CD36	Iglambda CD14	CD19	CD5	CD38	CD20 CD15	CD45	CD10 CD33	CD8	CD3

24 MoAbs

Even the dimmest of populations must be detected



What do Alligators eat?
Alligators Eat Almost Any Type of Animal Including Snails, Turtles, Fish, Birds & Mammals

Hoe meet je kwaliteit en
hoe verkrijg je
harmonisatie

External Quality Assessment (EQA)
Wat is het, en wat is de meerwaarde?



Benefits of External Quality Assessments

- Laboratory mistakes are prevented
- Significant improvements in testing performance can be achieved*

*Research findings from the College of American Pathologists, the University of Wisconsin, and the Centers for Disease Control and Prevention

- Interlaboratory comparison
- Standardization: One value for treatment evaluation
- Education
- Accreditation



SIHON / SKML:
EQA voor leukemie / lymfoom IFT

SIHONSCORE

Pre-ana., ana., post-ana. fase
Pre-ana., ana., post-ana. fase

An "A", "B" or "C", that's the question???

SIHON EQA PROGRAMMA (I)

- 60 Deelnemers: 45 NL, 15 BE
- Monsters tweemaal per jaar: 3 samples
- Materiaal: vers niet-gestabiliseerd bloed met meestal >10% maligne cellen
- Informatie: summiere klinische data en vraagstelling
- Terugrapportage (>95% van deelnemers)

Uitgangspunt van de kwaliteitscontrole:

Niet alleen een eindconclusie v.w.b. afwijkende populatie
maar ook de weg er naar toe als ook de evaluatie van de
gehele populatie

SIHON EQA PROGRAMMA (II)

- Onafhankelijke beoordeling en scoring van data door nomenclatuur-commissie (6 leden)

• *Scoring-/beoordelingsysteem in ABC-score*

- Nabespreking in ledenvergadering: 2x per jaar

Mogelijkheid van discussie en eventuele bijstelling

Educatie

- Verslaglegging
- Website: www.CYTOMETRIE.nl / www.SKML.nl

Kwaliteit in de beoordeling

- Rapportage vorm: wat is relevant voor een immunofenotypering
- Objectief Scoring systeem voor evaluatie (ABC in pre-ana-post)
- Richtlijnen en Protocollen voor immunofenotypering:
 - minimale MoAb panel voor IFT
 - WHO-Tabellen van maligniteiten

Contactpersoon: Tel:
 Instituut: Fax:
 Laboratorium: E-mail:
 Code testmonster:

Monsterbewerking: **Analyse:**
 Ery-lysis 1- kleuren immunofluorescentie
 Gradiëntseparatie 2- kleuren immunofluorescentie
 Anders: 3- kleuren immunofluorescentie
 4- kleuren immunofluorescentie

Detectietechniek intracellulaire merkers:
 Microscoop
 Flowcytometer

1. Samenstelling van de totale celpopulatie:
 T-lymfo's: 2 %; Definitie SS/CD3 Rijpmonocytair: 0,1 %; Definitie SS/CD14
 B-lymfo's: 94 %; Definitie SS/CD19 Rijpmyeloid: 0,2 %; Definitie SS/CD15
 NK-lymfo's: 0,5 %; Definitie CD3-/CD1656 Blastair: _____ %; Definitie _____
 Plasmacellen: _____ %; Definitie _____ Overige: _____ %; Definitie _____

¹ Uit te drukken als fractie (%) van de leukocyten.
² Met welke parameter(s) is de betreffende subpopulatie gedefinieerd?

2. Definitie en gating van de afwijkende populatie :
 FSC/SSC Backgating: FL (CD² _____) op relevante populatie gevolgd door plaatsing van FSC/SSC-gate op deze populatie
 CD45 expressie en SSC
 Lineage gating m.b.v. CD² _____ CD19 _____ Anders, nl:

Geef aan in welke lineage de afwijkende populatie voorkomt:

T-lymfocytair / **B-lymfocytair** / NK-lymfocytair / Plasmacellulair / Mono-Myeloid / Niet geïdentificeerd

Noteer het percentage van de afwijkende cellen in de totale celpopulatie: 94 %¹.

NIEUW RAPPORTAGE FORMULIER

GEINTRODUCEERD IN 2002

1. Technische gegevens

2. Evaluatie gehele celpopulatie

Samenstelling: hoe en waarmee

3. Definitie de afwijkende populatie(s)

- **Op basis waarvan is deze populatie vastgesteld**
- **Cellijn met de afw. populatie en %**

4. Analyse van de afw. populatie

- **Pos/neg**
- **% pos**
- **IF intensiteit**

5 Interpretatie / conclusie

Kwaliteit in de beoordeling

- Rapportage vorm: wat is relevant voor een immunofenotypering
- Objectief Scoring systeem voor evaluatie (ABC in pre-ana-post)
- Richtlijnen en Protocollen voor immunofenotypering:
 - minimale MoAb panel voor IFT
 - WHO-Tabellen van maligniteiten

Minimale panels van monoclonale antilichamen voor immunofenotypering (introdunctie 2002)

(08-03-2009)

Immunologische markers die minimaal vereist zijn bij de SKML-Leukemia/Lymfoom rondzendingen

Immunologische differentiatie

altijd	
T-cellen	CD3 (evt. + SSC)
B-cellen	CD19, CD20 of CD22 (evt. +SSC)
NK-cellen	CD3- /CD(16.)56+ (evt. +SSC)
monocyten	CD14+ (evt. +SSC) of CD13,33/SSC
rijp myeloid blasten*	CD13 en/of CD33 en SSC of CD15 en SSC
indien aanwezig plasmacellen*	CD34 (evt +CD45 en/of SSC)
afwijkende populatie	CD38 of CD138 (evt +CD45 en/of SSC)
	afhankelijk van fenotype

*alleen rapporteren indien >1%

T-ALL	
CD45	(lymfocyten)
CD34	
CD117	
TdT	
CyCD3 (indien SmCD3-)	
CD1	
CD2	(T-cel)
CD3	(T-cel)
CD4	(T-cel)
CD5	(T-cel)
CD7	(T-cel)
CD8	(T-cel)
CD10	
HLA-DR	

[voorloper] B-ALL	
CD45	(precursor B)
CD34	
CD117	
TdT	
CD79a	
CD10	
CD19	(B-cel)
CD20	(B-cel)
CD22	(B-cel)
CD13	
CD33	
CyIgM (indien SmIgM-)	
SmIgu	(B-cel)

AML	
CD45	(precursor myeloid)
CD34	
CD117	
MPO	
CD4	
CD7	
CD11b / 11c	
CD13	
CD14	(monocyt)
CD15	(granulocyt)
CD16	
CD19	
CD33	(granulocyt)
CD36	
CD56	
CD61 / 41	
CD235a	
HLA-DR	

rijp T-cel / NK-cel	
CD45	(lymfocyten)
TdT	
CyCD3 (indien SmCD3-)	
CD1	
CD2	(T-cel)
CD3	(T-cel)
CD4	(T-cel)
CD5	(T-cel)
CD7	(T-cel)
CD8	(T-cel)
CD16	
CD25	
CD56	
CD57	(T-cel)
TCRalpha-beta*	
TCRgamma-delta*	
HLA-DR	

rijp B-cel	
CD45	(lymfocyten)
CD5	(T-cel)
CD10	
CD11c	
CD19	(B-cel)
CD20	(B-cel)
CD22	(B-cel)
CD23	
CD25	
CD38	
CD103	
FMC7	(B-cel)
SmIlgkappa	(B-cel)
SmIglambda	(B-cel)

plasmacel	
CD45	(plasmacel)
CD19	(B-cel)
CD20	(B-cel)
CD38	(plasmacel)
CD56	
CD138 / VS38c	
CyIlgkappa	
CyIglambda	

*(indien SmCD3+)

Rood gemerkte markers: indien de marker niet negatief is, dient altijd de afwijkende mate van expressie (minimaal 0,5 log verschil) t.o.v de tussenhaakjes vermelde referentie populatie gerapporteerd te worden

Opmerking: Van de overige markers alleen de expressie vermelden indien deze afwijkend is van de normale cellineage populatie

WWW.CYTOMETRIE.NL

Kwaliteit van de beoordeling

- Rapportage vorm: wat is relevant voor een immunofenotypering
- Objectief Scoring systeem voor evaluatie (ABC in pre-ana-post)
- Richtlijnen en Protocollen voor immunofenotypering:
 - minimale MoAb panel voor IFT
 - WHO-Tabellen van maligniteiten

Kwaliteit in de beoordeling

- Rapportage vorm: wat is relevant voor een immunofenotypering
- Objectief Scoring systeem voor evaluatie (ABC in pre-ana-post)
- Richtlijnen en Protocollen voor immunofenotypering:
 - minimale MoAb panel voor IFT
 - WHO-Tabellen van maligniteiten

Objectivering van scoring

SIHON scoringsysteem

Pre-analytisch:

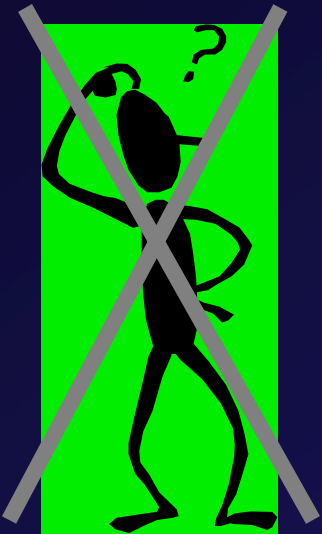
- A **Cellijndefiniërende** markers en **subklassificering** volgens SIHON richtlijnen
- B **Onvolledig**: subklassificatie ontbreekt (1 of 2 markers ontbreken)
- C **Essentiële markers (meer dan 2) ontbreken**

Analytisch:

- A Volledig **goede** analyse
 - B **1 of 2 markers afwijkend**, ook niet relevante markers (</> 20%-grens; TdT: </> 10%-grens)
 - C **Meer dan 2** markers afwijkend
- Noot: Afwijkend t.o.v. deelnemersgroep of t.o.v. andere markers binnen betreffende cellijn: bijv. CD5 t.o.v. CD3*

Post-analytisch:

- A Cellijn en subklassificatie zijn **juist**
- B Cellijn juist, **subklassificatie niet** volledig
- C **Cellijn fout of niet gefundeerde** conclusie
- D **Wel deelname geen resultaten ingezonden**



Resultaten

- A. Invloed van meer kleuren IF
- B. Invloed van richtlijnen (2002)
- C. Invloed van moeilijkheidsgraad casus

Dutch EQA for leukemia and lymphoma (SIHON/SKML)

	<u># participants</u>	
	<u>2002</u>	<u>2011</u>
1,2-colors	10 (18%)	0 (0%)
2- and 3-colors	12 (22%)	2 (3%)
3-colors	25 (45%)	5 (8%)
4-colors	8 (15%)	31 (52%)
5-colors	0	7 (12%)
6-8-10 colors	0	15 (25%)

SIHONscore 1998-2009

Overall results on 72 specimens¹

Overall
results

Score	Pre-analytical	Analytical	Post-analytical
A	57	44	68
B	30	46	23
C	11	8	9

**Nieuwe
richtlijnen
2002-2006
30 specimen**

Score	Pre-analytical	Analytical	Post-analytical
A	59	40	73
B	30	49	20
C	9	10	7

1998-2002
24 specimen

Score	Pre-analytical	Analytical	Post-analytical
A	56	60	58
B	31	38	29
C	13	0	13

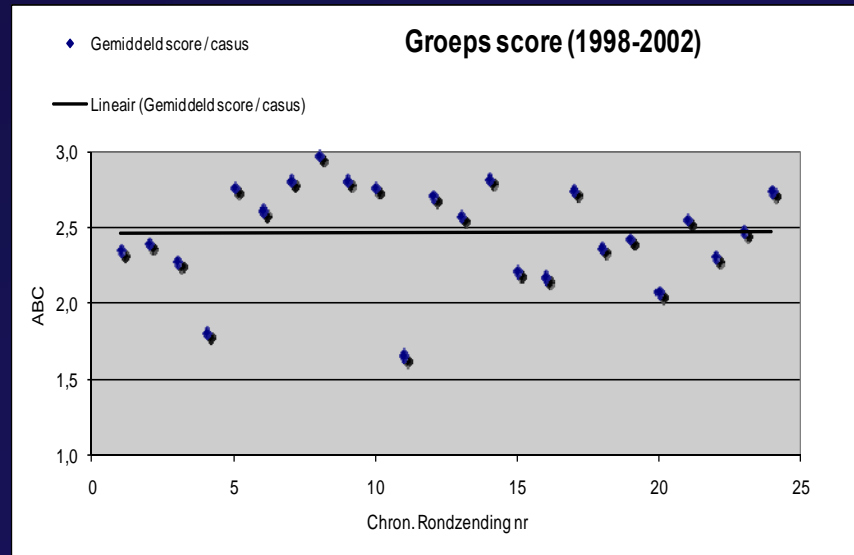
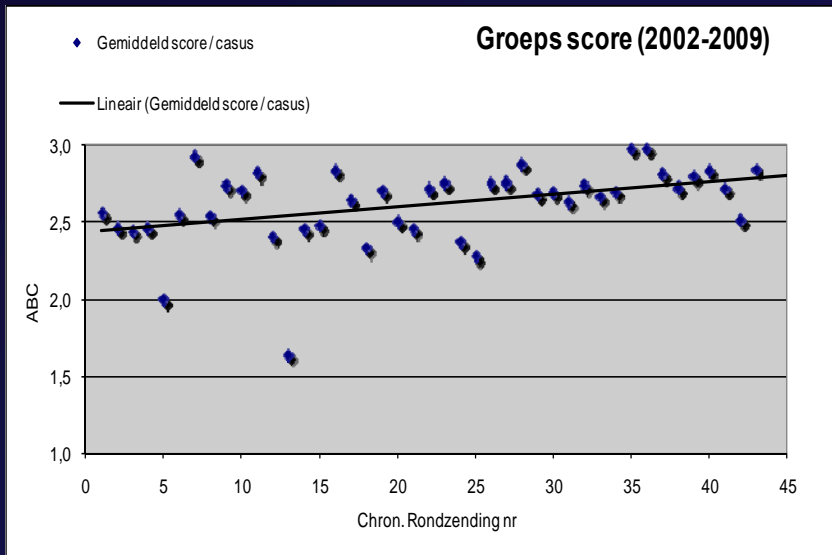
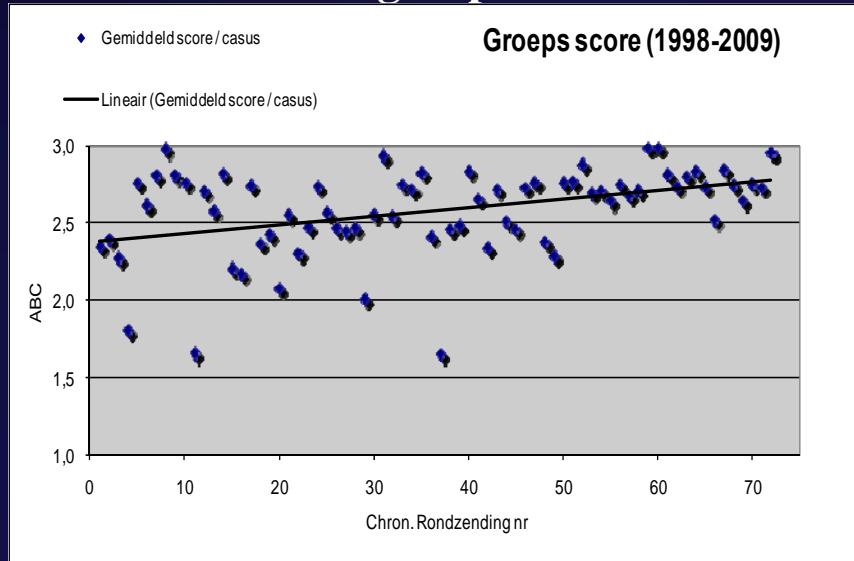
¹ Median (range) percentages of all participants/specimen obtaining scores A, B and C are shown.

Leukemia/lymphoma EQA Learning curves

Invloed van richtlijnen op de leercurve van de groep van deelnemers

Post-analytic phase

- A. 3 points = right conclusion
- B. 2 points = only right lineage
- C. 1 point = wrong conclusion



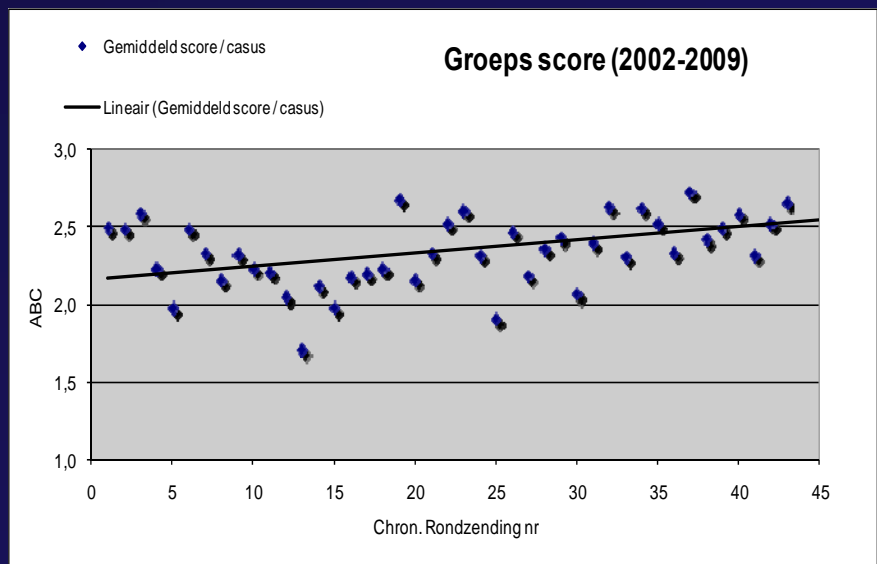
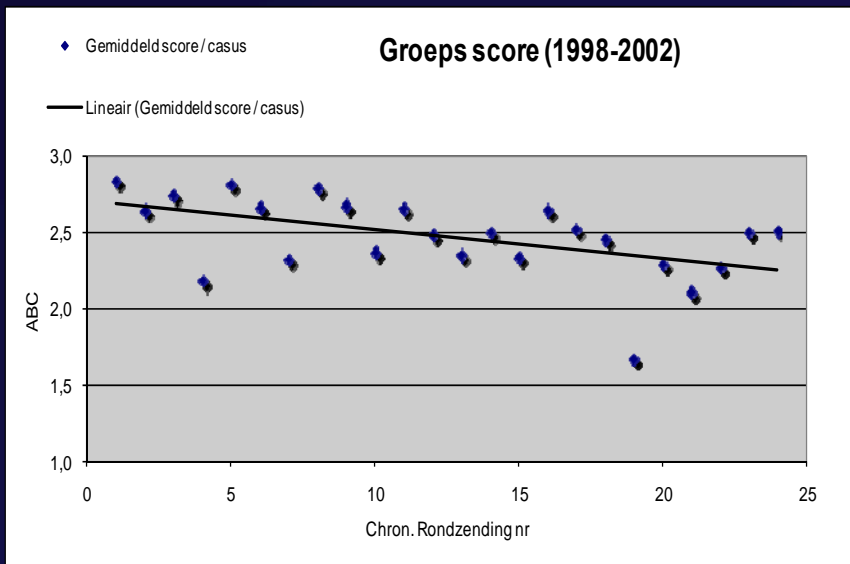
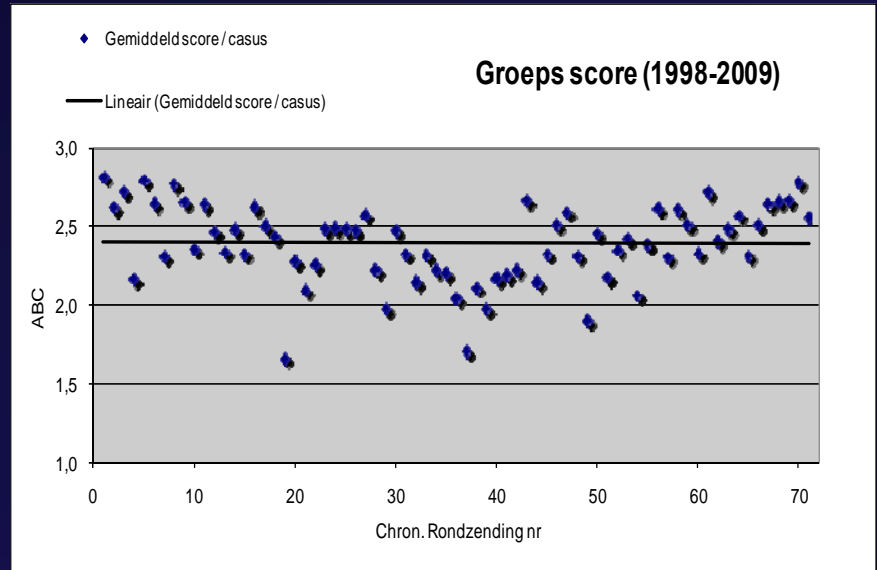
Conclusion: relation between improvement of performance and number of colors

Leukemia/lymphoma EQA Learning curves

Invloed van richtlijnen op de leercurve van de groep van deelnemers

Pre-analytic phase

- A. 3 points = right conclusion
- B. 2 points = only right lineage
- C. 1 point = wrong conclusion



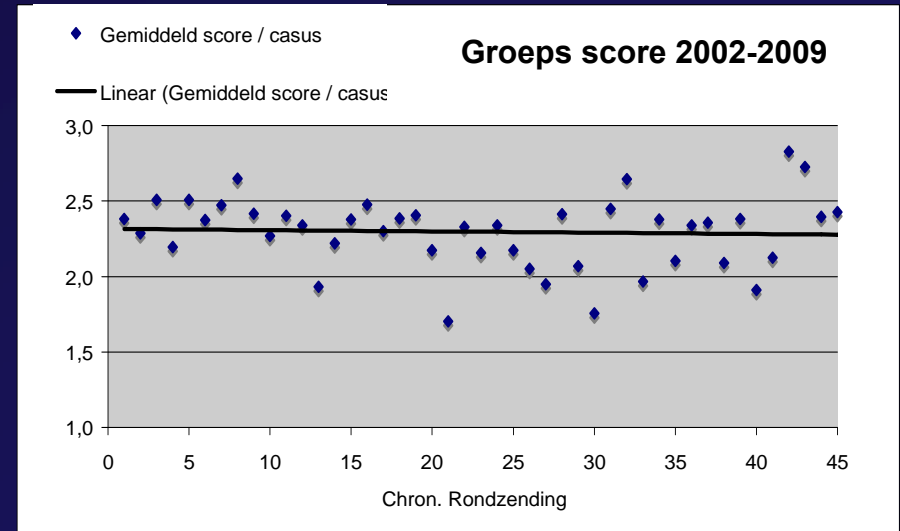
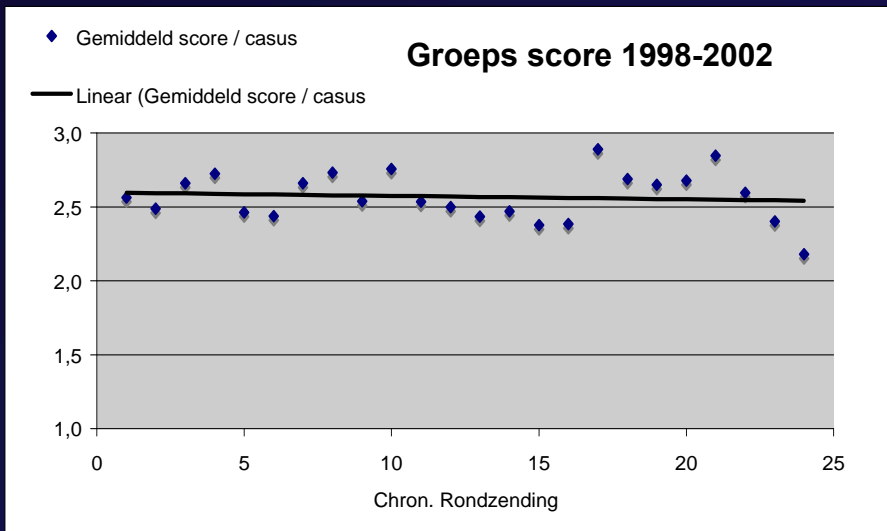
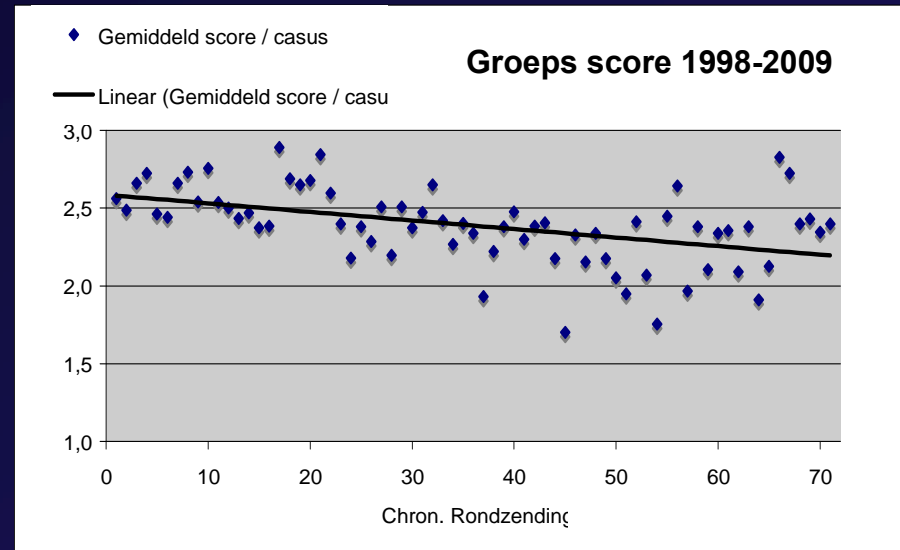
Conclusion: relation between improvement of performance and number of colors

Leukemia/lymphoma EQA Learning curves

Invloed van richtlijnen op de leercurve van de groep van deelnemers

Analytic phase

- A. 3 points = right conclusion
- B. 2 points = only right lineage
- C. 1 point = wrong conclusion



Conclusion: relation between improvement of performance and number of colors

Overall resultaten in 72 specimens

I. Evaluatie per maligniteit: Historische score verloop

Evaluatie gebaseerd op de resultaten van alle deelnemers
samen per rondgezonden casus:

mediaan van alle percentages van A's, B's en C's per casus
in de tijd

(Methode: het % van A, B en C van alle deelnemers van één
cases > idem voor alle rondgezonden cases
-> mediaan van alle rondzendingen)

a. overall score

b. score bij specifieke cases

SIHONscore 1998-2009

Pre-analytical phase per malignancy

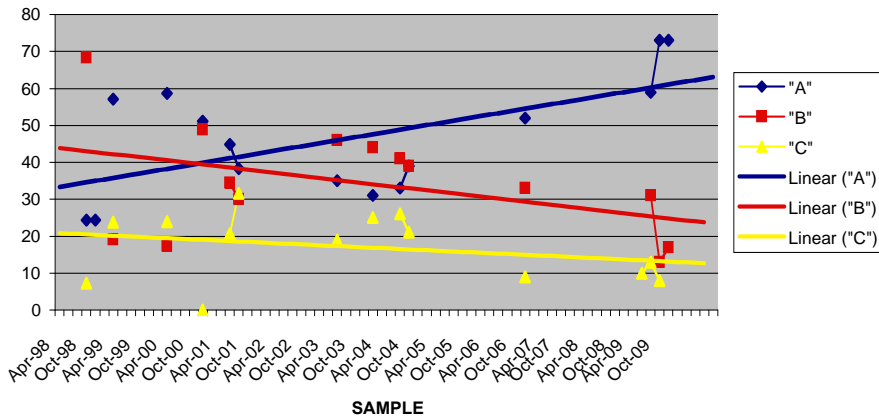
Score	Mat.T (n=14)	Mat.B (n=23)	Imm.B+T (n=13)	Imm.My (n=15)	Other ¹ (n=4)
A	45	58	66	51	29
B	34	30	26	34	30
C	25	12	9	13	33

Median percentages of all participants/specimen obtaining scores A, B and C are shown.

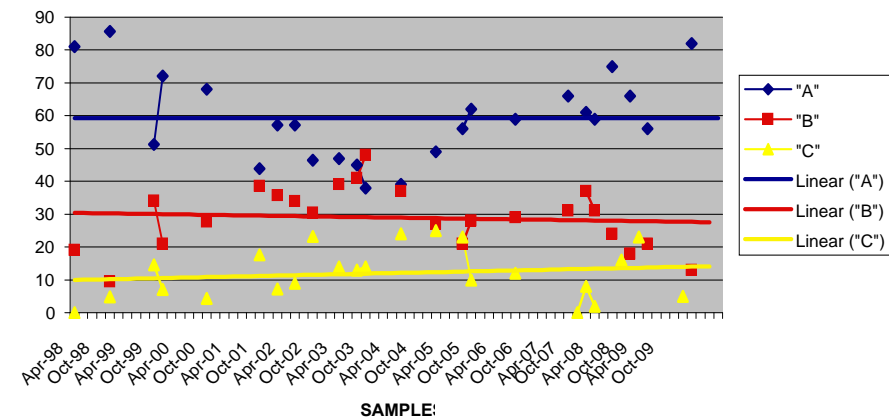
¹ 1x NK-lymphocytosis, 1x bilineage (B/My), AML+CLL, NK-LGL

Pre-analytical phase

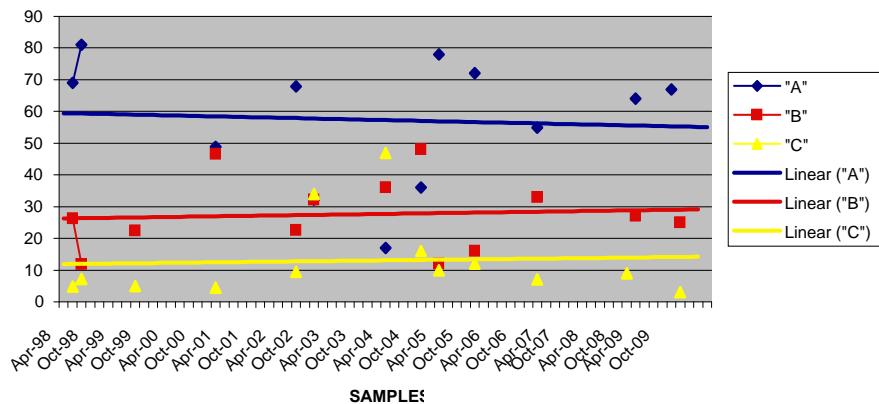
mature T-cell malignancies (n=14)



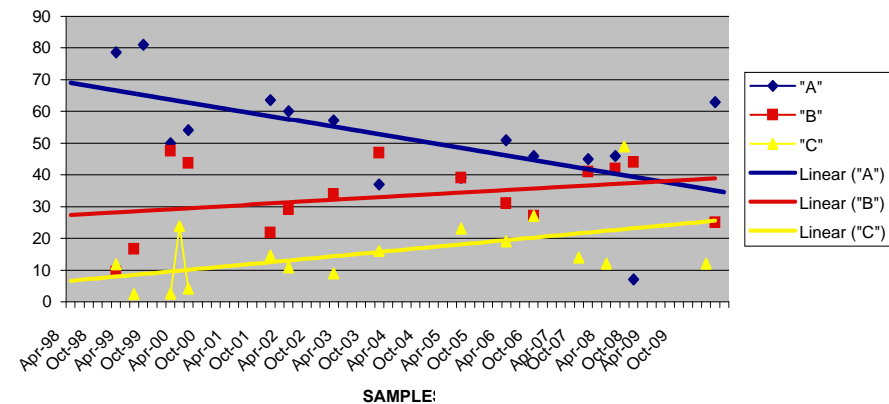
mature B-cell malignancies (n=23)



Immature B+T-cell (n=13)



Immatuur myeloid (n=15)



SIHONscore 1998-2009

Analytical phase per malignancy

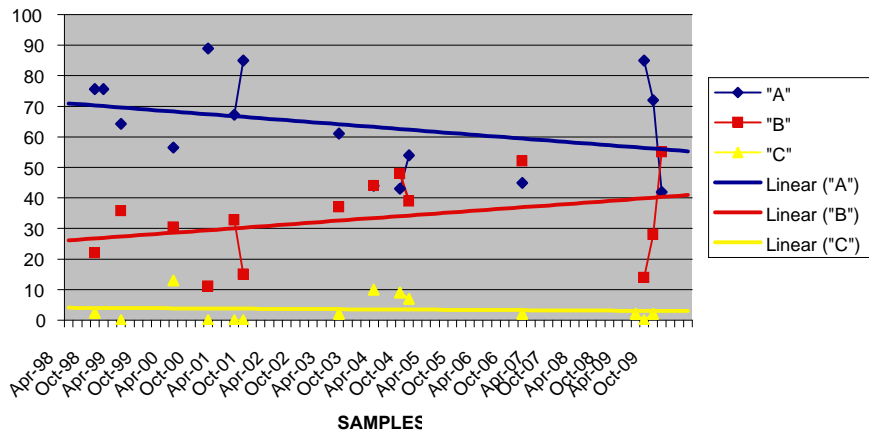
Score	Mat.T (n=14)	Mat.B (n=23)	Imm.B+T (n=13)	Imm.My (n=15)	Other ¹ (n=4)
A	64	42	47	45	41
B	34	47	49	46	48
C	2	7	5	10	10

Median percentages of all participants/specimen obtaining scores A, B and C are shown.

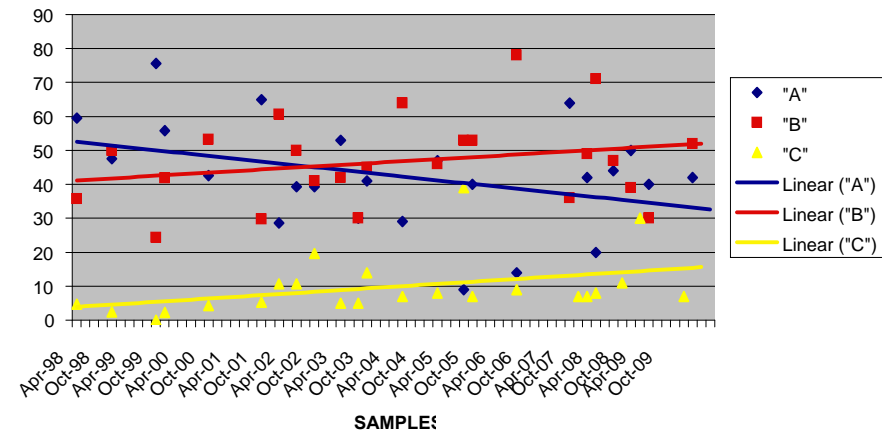
¹ 1x NK-lymphocytosis, 1x bilineage (B/My), AML+CLL, NK-LGL

Analytical phase

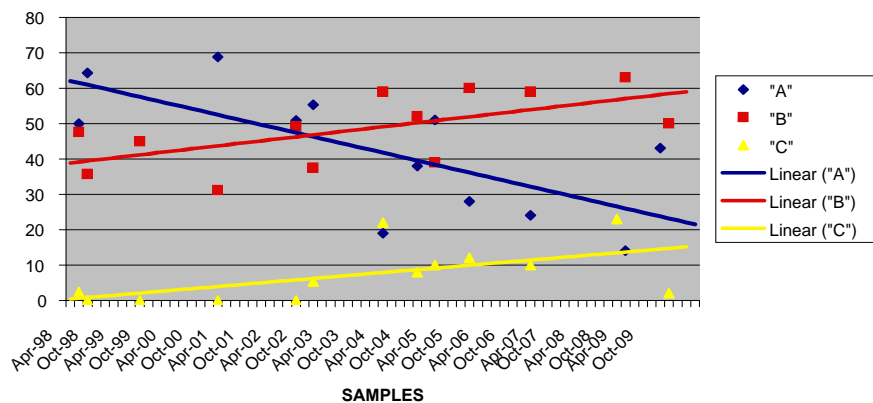
mature T-cell malignancies (n=14)



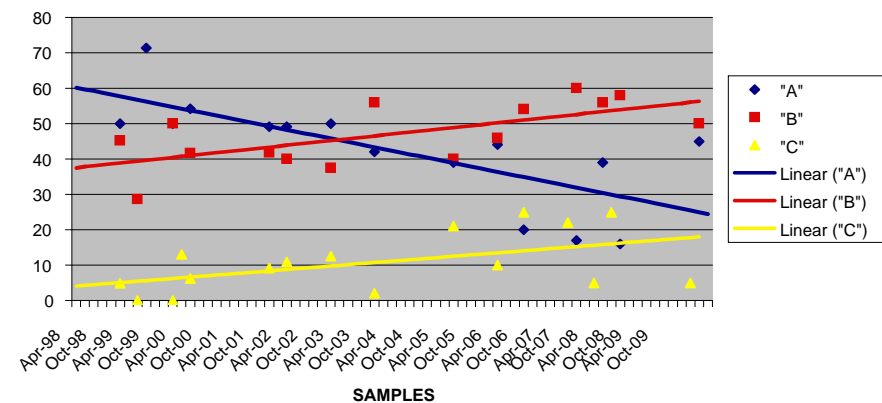
mature B-cell malignancies (n=23)



Immature B+T-cell (n=13)



Immatuur myeloid (n=15)



SIHONscore 1998-2009

Post-analytical phase per malignancy

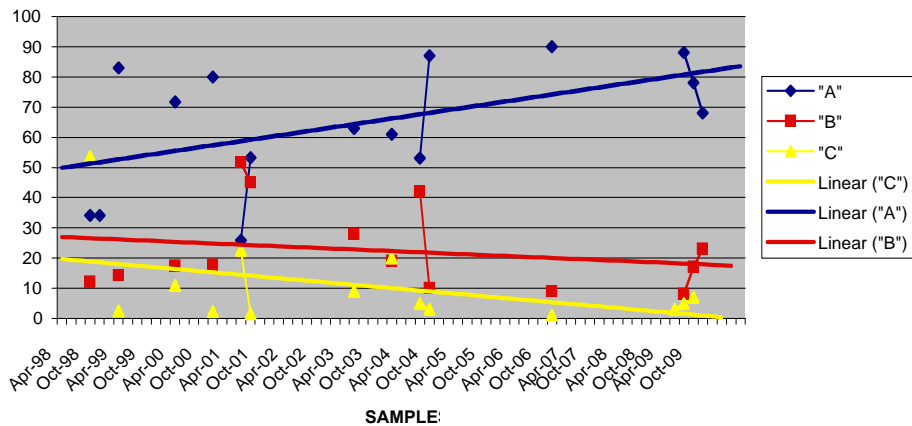
Score	Mat.T (n=14)	Mat.B (n=23)	Imm.B+T (n=13)	Imm.My (n=15)	Other ¹ (n=4)
A	68	74	66	71	63
B	18	24	24	15	26
C	5	5	11	6	10

Median percentages of all participants/specimen obtaining scores A, B and C are shown.

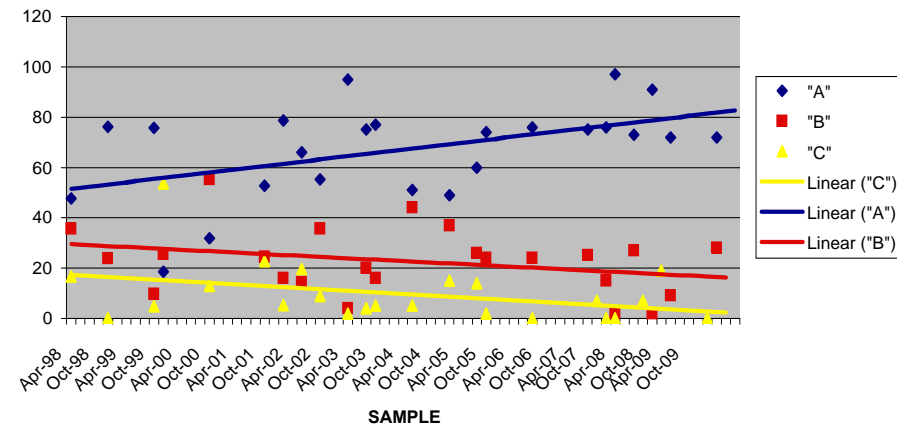
¹ 1x NK-lymphocytosis, 1x bilineage (B/My), AML+CLL, NK-LGL

Post-analytical phase

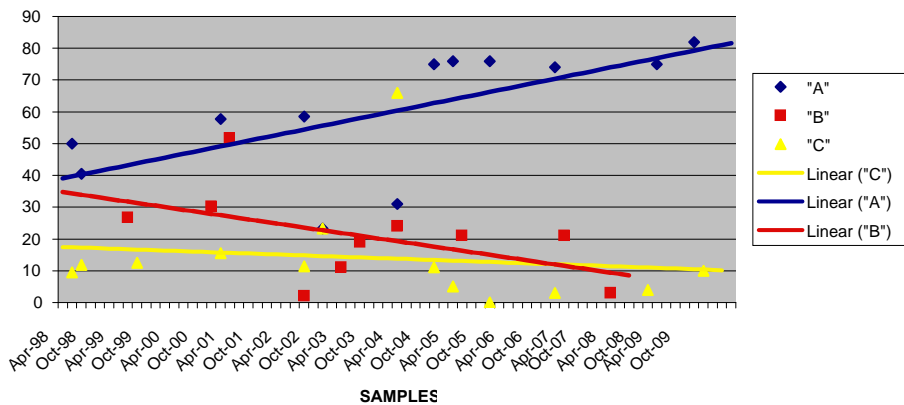
mature T-cell malignancies (n=14)



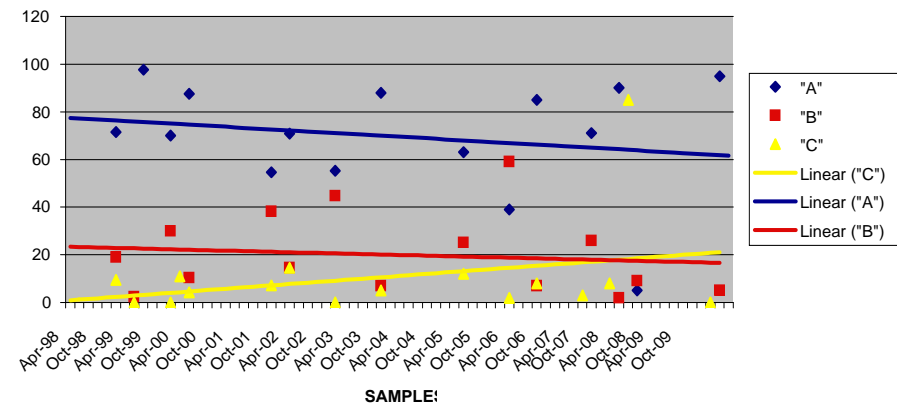
mature B-cell malignancies (n=23)



Immature B+T-cell (n=13)



Immatuur myeloid (n=15)



Post-Analytical Phase: Vijf Beste en Vijf Slechtste Cases

Specimen Nummer	Diagnose	% Labs met A-Score
Vijf Beste Cases		
5	AML	98
31	CLL	97
72	AML	95
31	HCL	95
64	CLL	91
Vijf Slechtste Cases		
63	AML	5
11	LyBC/B-CLL	19
29	AUL/Pro-B-ALL	23
50	Bilineage (B/My)	30
37	Pro-T-ALL	31

Conclusies

- Standaardisatie in IFT is utopie (?) maar kwaliteit van analyse neemt toe door (mede) EQA en educatie.
- SIHON: objectieve beoordeling van EQA door:
 - Rapportage formulier: totale celpopulatie en afwijkende populatie
 - Uniek SIHON scoring systeem
 - Definitie van minimale MoAb panels
- EQA schema's voor L en L zijn moeilijk te vergelijken door variatie in de moeilijkheidsgraad van de testmaterialen
- Hoewel moeilijkheidsgraad immunofenotyperingen toegenomen, toch een verbetering van de conclusies (post-ana-fase) in de tijd ('98-'02 versus '02-'09): invoering richtlijnen resulteert in betere score (kwaliteitsverhoging)



Thanks for your attention



© guy & rodd, Dist. by UFS



Save the date!

NCytometrie en kwaliteit; SIHON 25 jaar Ó

Jubileumcongres voor externe kwaliteitsbewaking en toekomstperspectieven in de flowcytometrie

Nederlandse Vereniging voor Cytometrie
SKML sectie ICD

Donderdag 24 en vrijdag 25 november 2011

Voor meer informatie kijk op
www.cytometrie.nl

