

The background features a gradient from dark purple to blue, overlaid with faint technical diagrams of circular gauges and arrows. A starry space pattern is visible in the lower right quadrant.

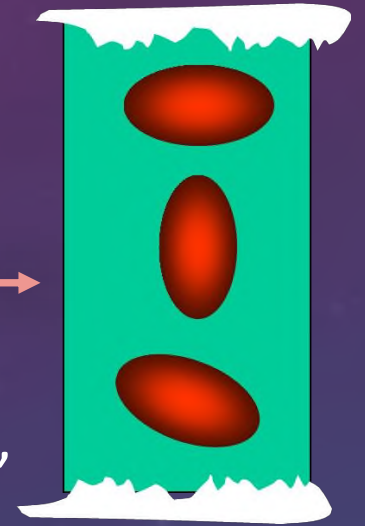
Η ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

ΜΑΡΙΑ ΓΕΩΡΓΙΟΥ, PhD
LERIVA DIAGNOSTICS

1947 Gucker, προσδιορισμός βακτηρίων και σπόρων σε αερολύματα

1964 Mack Fulwyler & Clarence Lushbaugh : 2 είδη ερυθροκυττάρων? →

1965 Mack Fulwyler & Richard Sweet (πρώτη δημοσίευση νέας τεχνολογίας, Κυτταροδιαχωριστής Ροής)



1969 Leonard Herzenberg, Wolfgang Gohde, Cezar Milstein, George Kohler : Monoclonal Abs + FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)

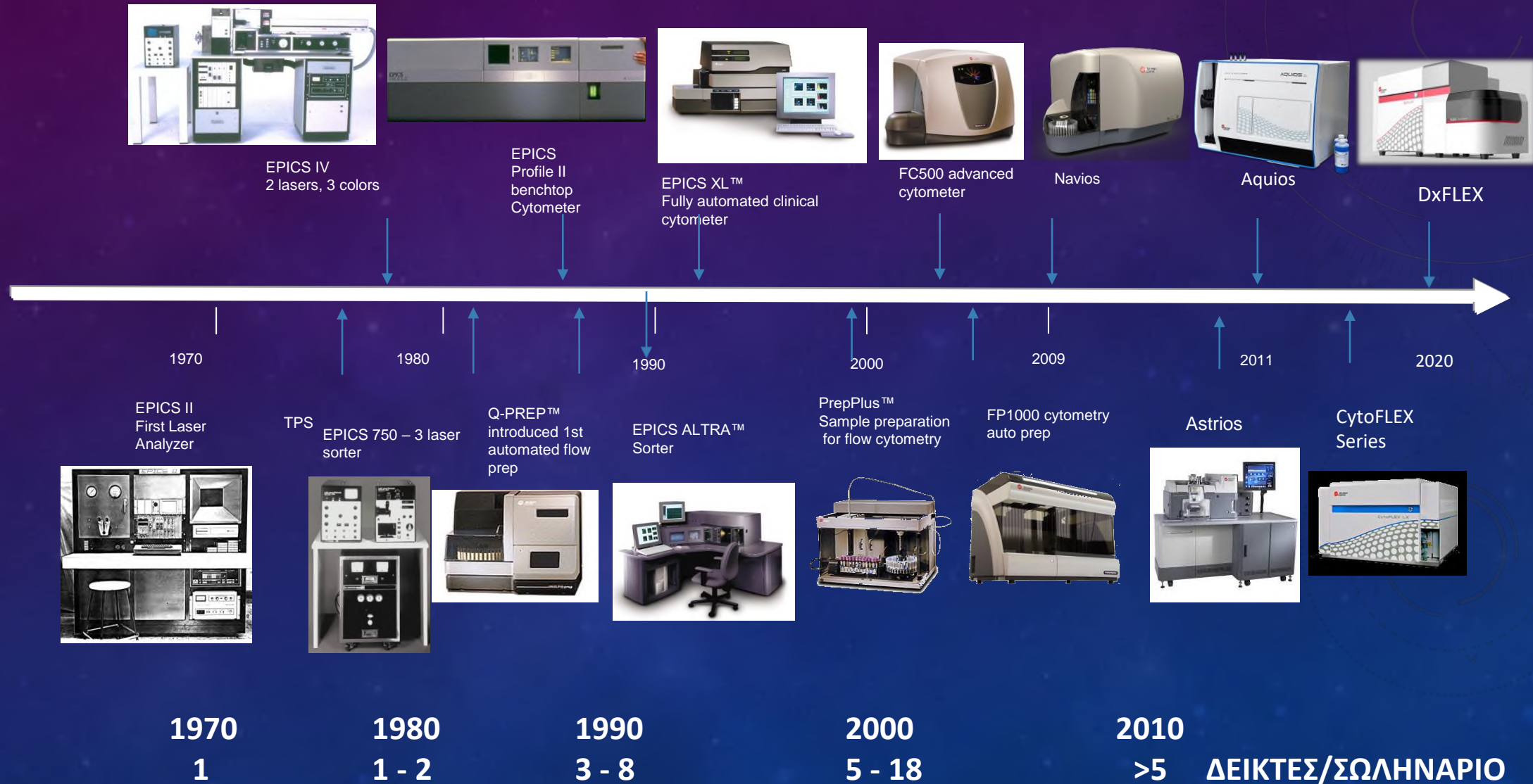
Μέσα της δεκαετίας **1970**, Joseph Gray, αναπτύσσει μεθόδους για προσδιορισμό και διαχωρισμό χρωμοσωμάτων

Βραβείο Nobel Ιατρικής 2019, W. G. Kaelin Jr., Sir P. J. Ratcliffe και G. L. Semenza
Ανακάλυψαν τους μοριακούς μηχανισμούς ελέγχου του σώματος στην αλλαγή επιπέδων οξυγόνου. Η κυτταρομετρία ήταν μία από τις βασικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν.

Fulwyler's Sorter



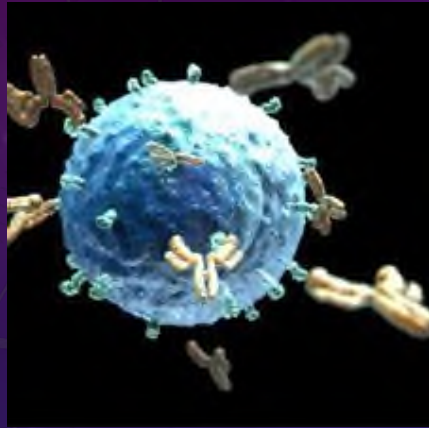
ΕΞΕΛΙΞΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ (BECKMAN COULTER)



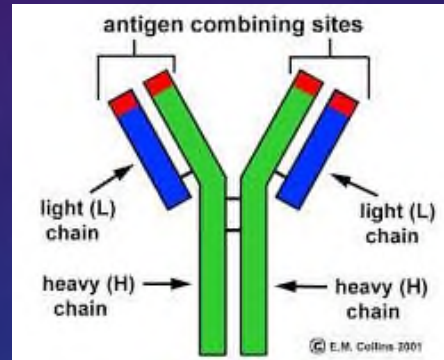
ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Με την Κυτταρομετρία Ροής προσδιορίζουμε το είδος των σωματιδίων (κυττάρων) σε ελαιώρημα και μπορούμε να μελετήσουμε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες

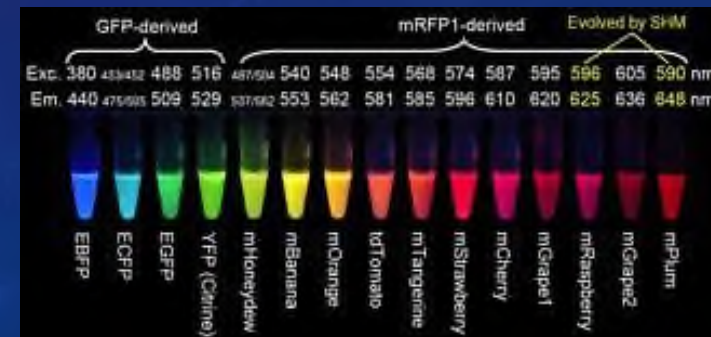
ΚΥΤΤΑΡΑ



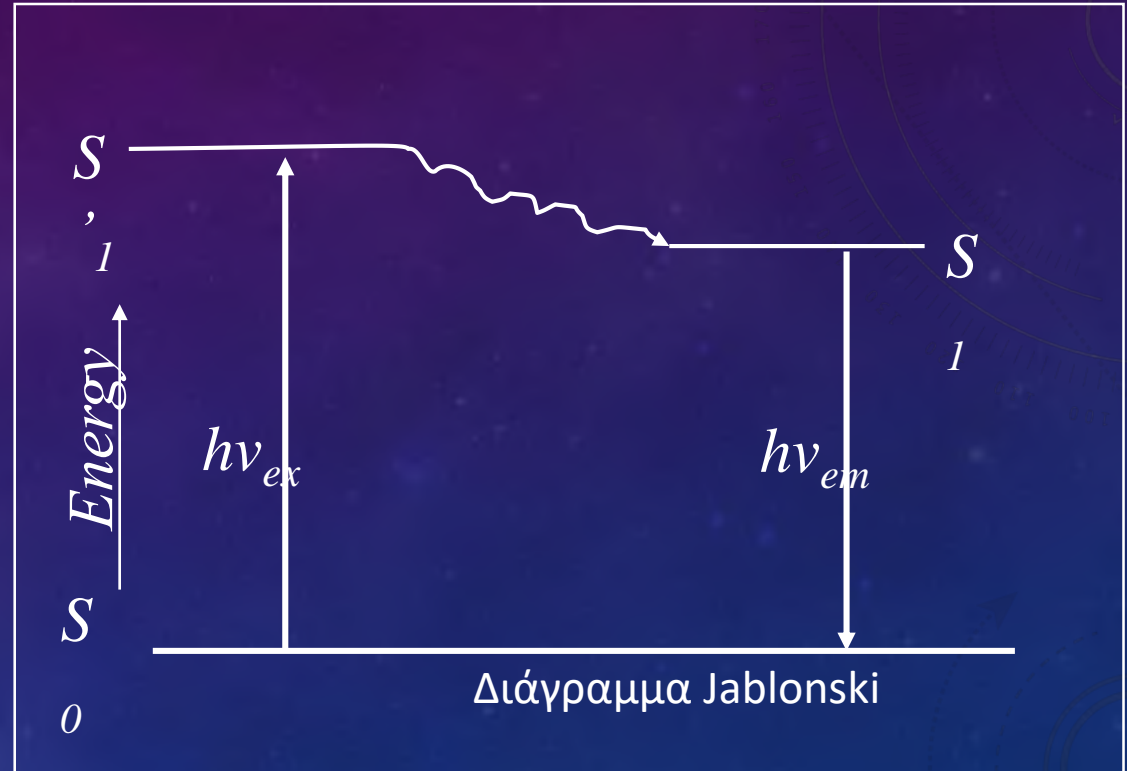
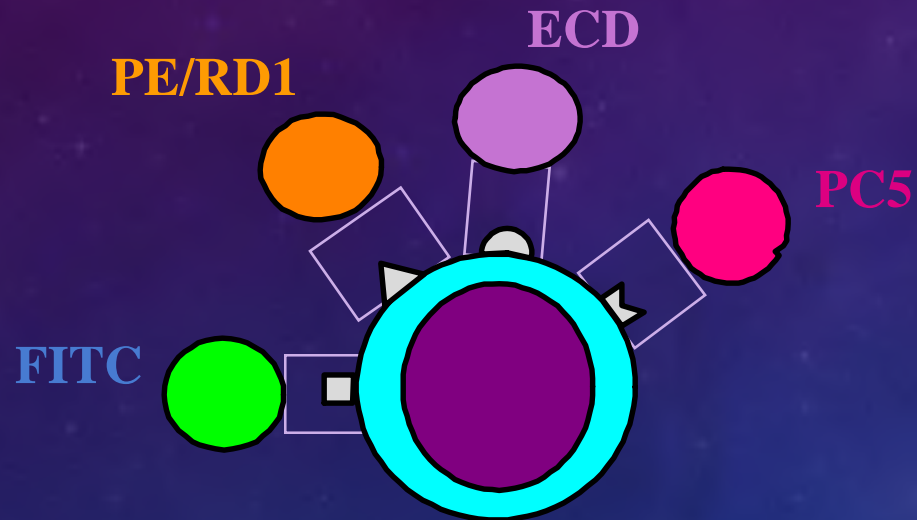
ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ
ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ







ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ



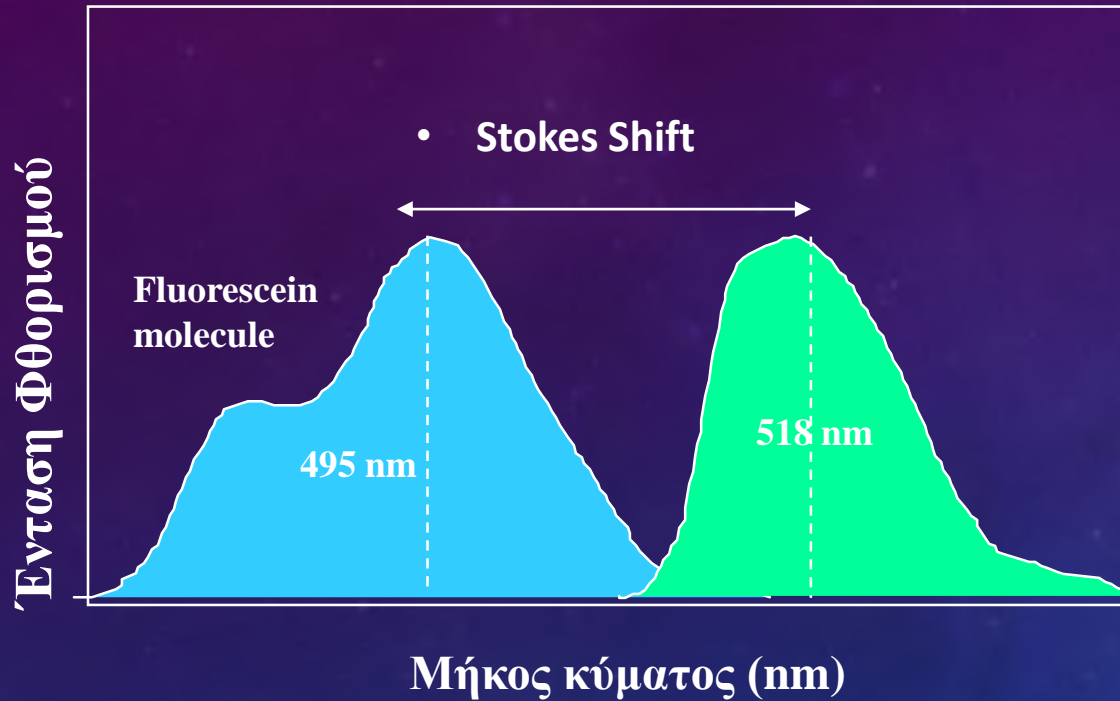
ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ : ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ ΚΑΘΕ ΚΥΤΤΑΡΟΥ



ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

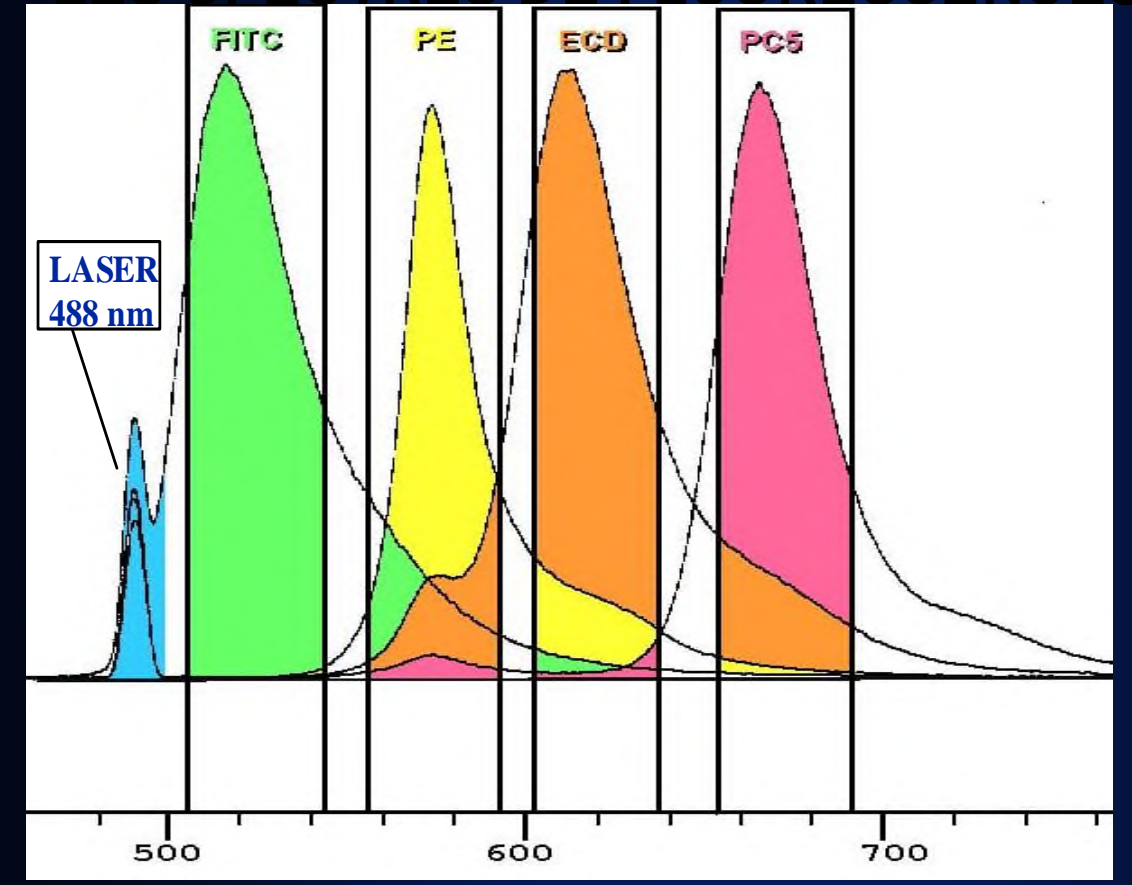
-  FITC
-  RD1/PE
-  ECD
-  PC5

ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ



Αλληλεπικάλυψη φασμάτων εκπομπής

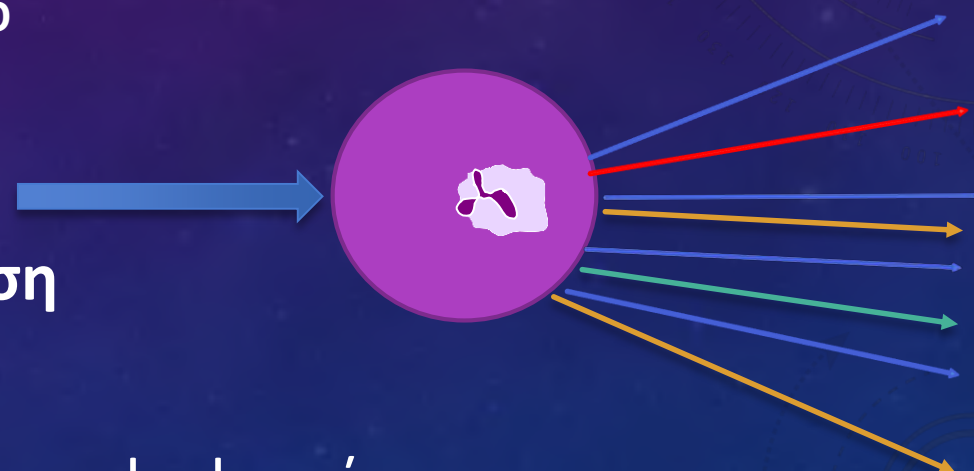
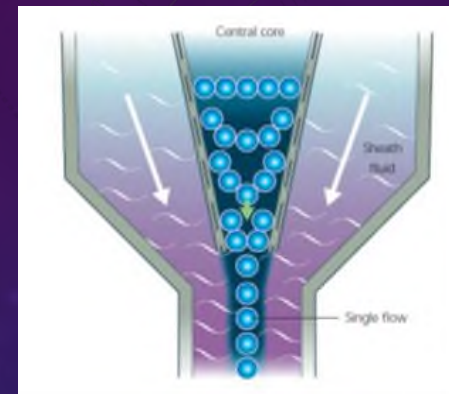
Ανάγκη για διορθωση της αντιστάθμισης των
CYTOMETRIE EN FLUX
φθορισμών (compensation)
LES SPECTRES DE FLUORESCENCES



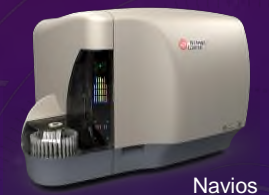
1
1 s
d'é
flu

Υδροδυναμική Εστίαση =>μονήρη κύτταρα σε νηματική ροή

- Σκέδαση από ένα ή περισσότερα laser
- Πρόσθιος σκεδασμός Forward scatter (FS) $1-19^\circ$ μέγεθος
- Πλάγιος Σκεδασμός Sideward Scatter (SS) , 90° κοκκίωση
- Συλλογή σημάτων φθορισμού, 90° τυποποίηση
 - Ηλεκτρονικό Σύστημα, μετατροπή σημάτων σε ψηφιακά, αποθήκευση δεδομένων, δυνατότητα για Πολυμετρική Ανάλυση
- Ηλεκτροστατικός διαχωρισμός σωματιδίων (FACS)



Πολλαπλές πηγές LASER, ροή δείγματος



Navios



ΔΙΑΘΕΣΙΜΑ LASER ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ ΑΝΑ ΣΩΛΗΝΑΡΙΟ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ



	FITC	PE	ECD	PC5	PE-CY7
Σωλ 1	CD14	CD34		CD45	
Σωλ 2	DR	CD34		CD45	
Σωλ 3	CD13	CD34		CD45	
Σωλ 4	CD2	CD34		CD45	
Σωλ 5	CD19	CD34		CD45	

	FITC	PE	ECD	PC5	PE-CY7
Σωλ 1	CD14	CD13	CD34	DR	CD45
Σωλ 2	CD2	CD33	CD34	CD19	CD45

	405nm		488nm				633nm			
	Pacific Blue	Krome Orange	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC-A700	APC-A750
Σωλ 1	DR	CD45	CD2	CD13		CD19	CD33	CD34		CD14

ΣΤΙΚΤΟΓΡΑΜΜΑΤΑ (DOT PLOTS)

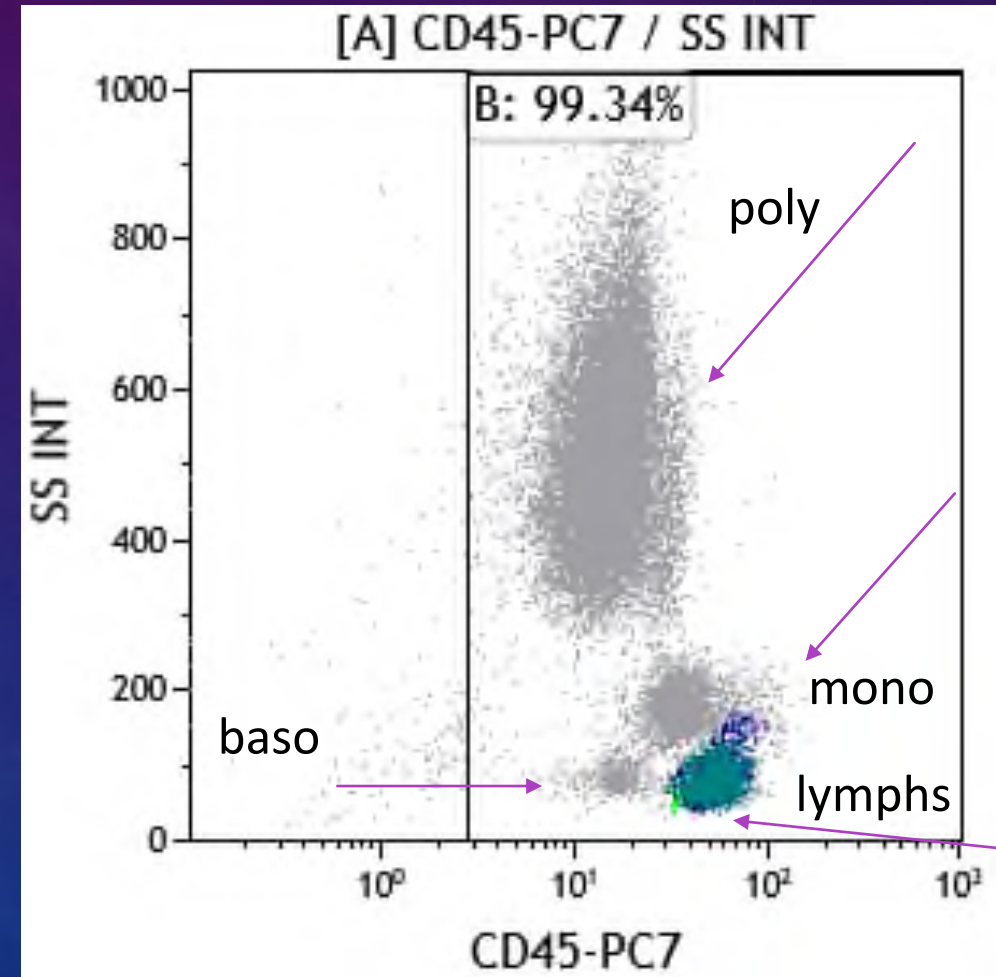
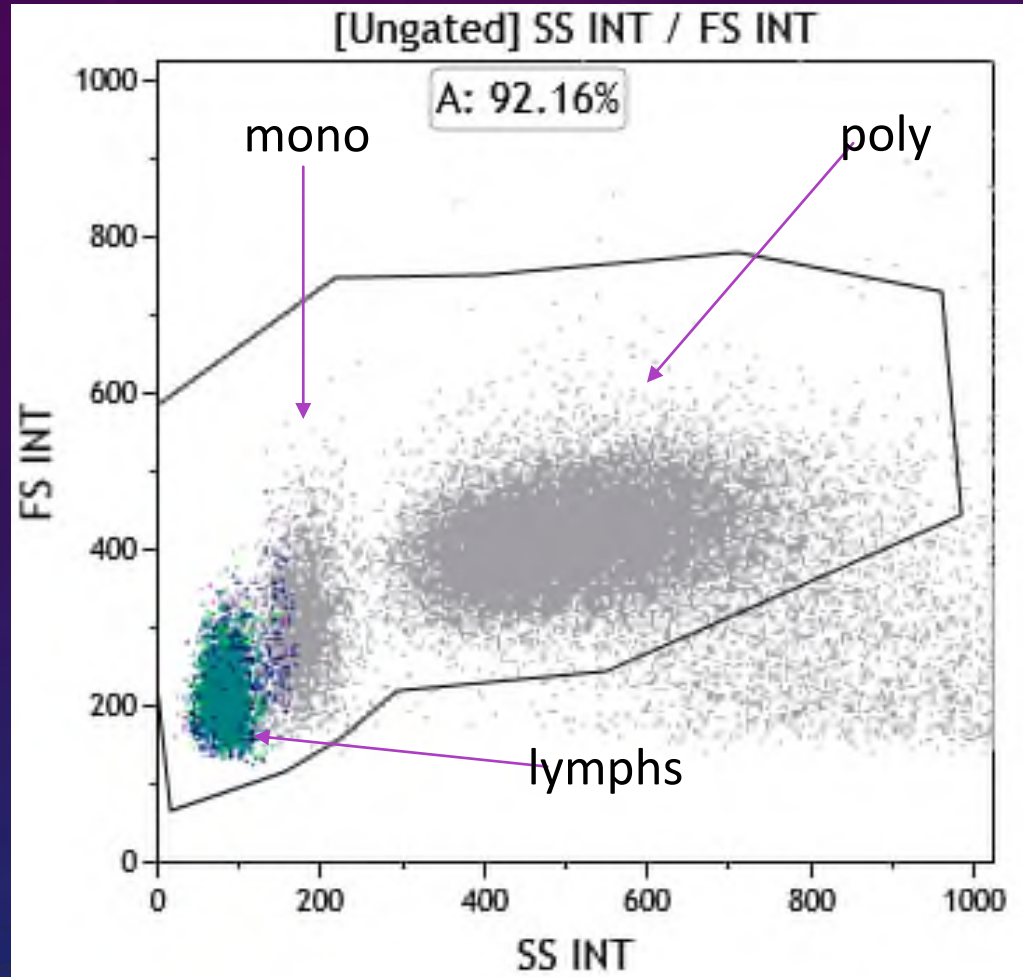
ΟΡΙΟΘΕΤΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (GATING)

ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

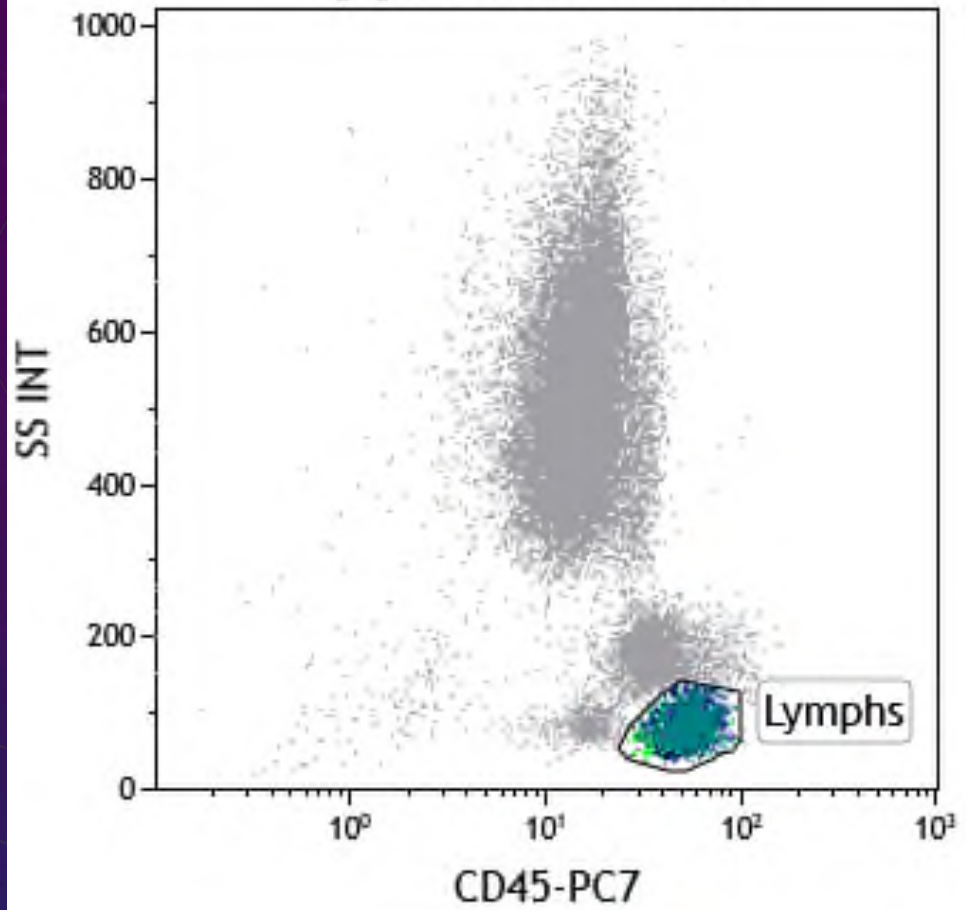
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ : ΣΚΕΔΑΣΗ SS/FS

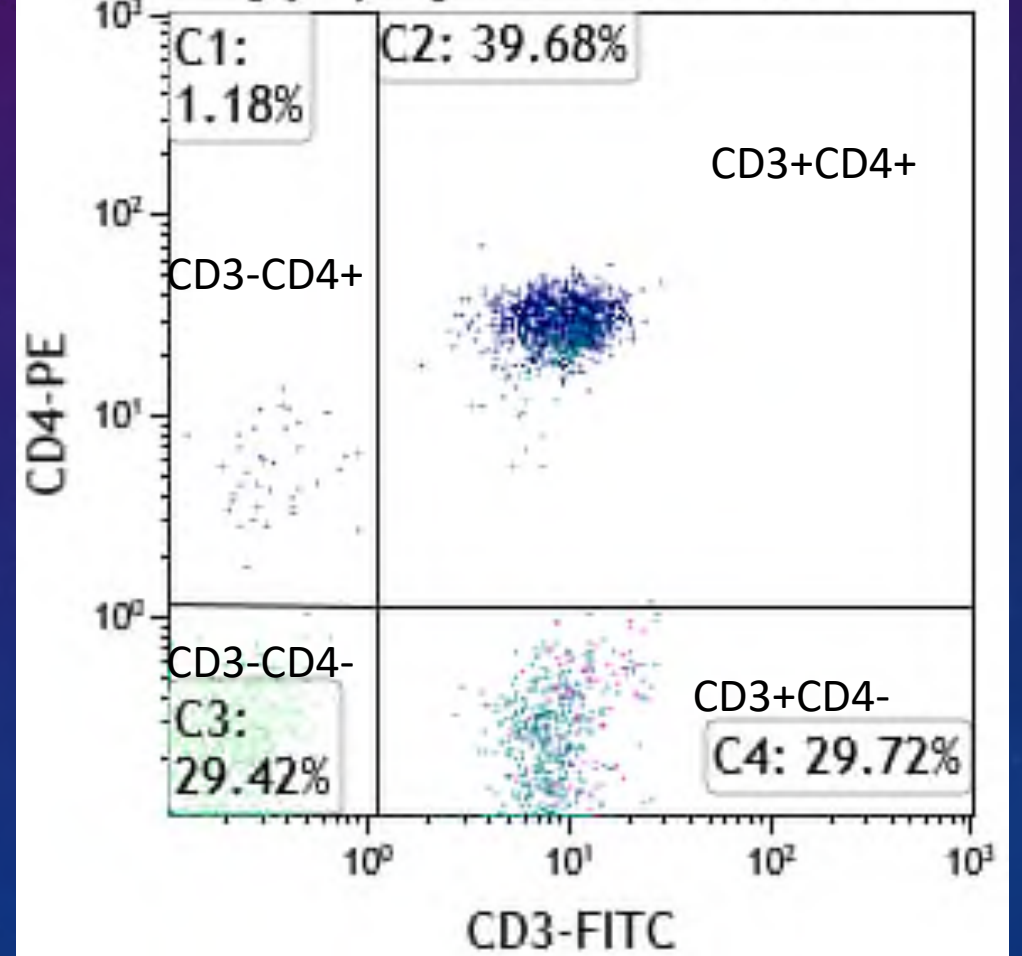
ΣΚΕΔΑΣΗ – ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ SS/FL



[A] CD45-PC7 / SS INT

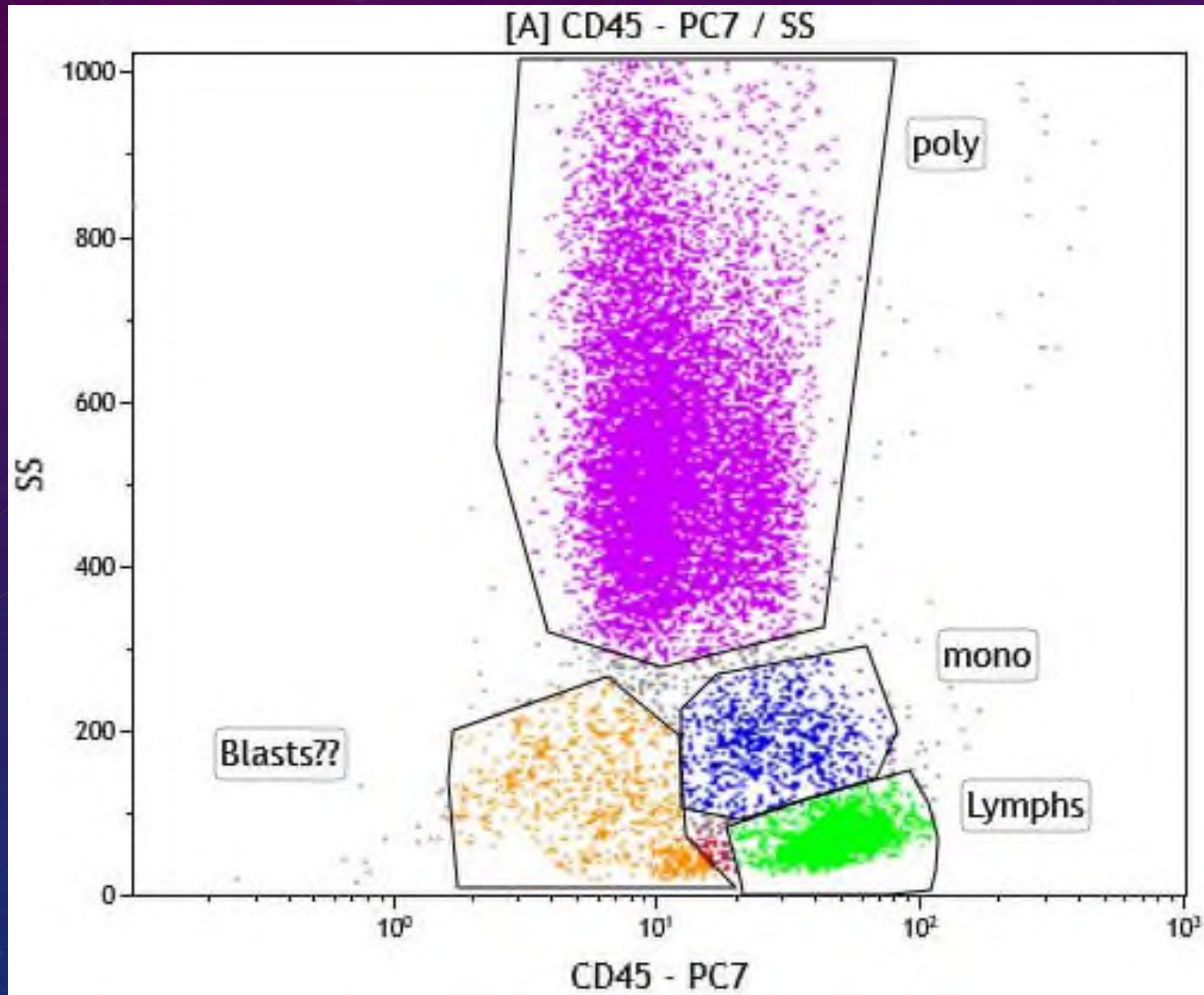


[Lymphs] CD3-FITC / CD4-PE



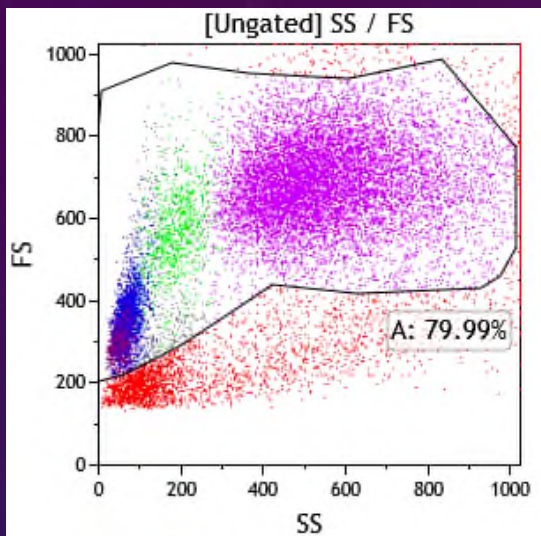
Μυελός

SS/CD45



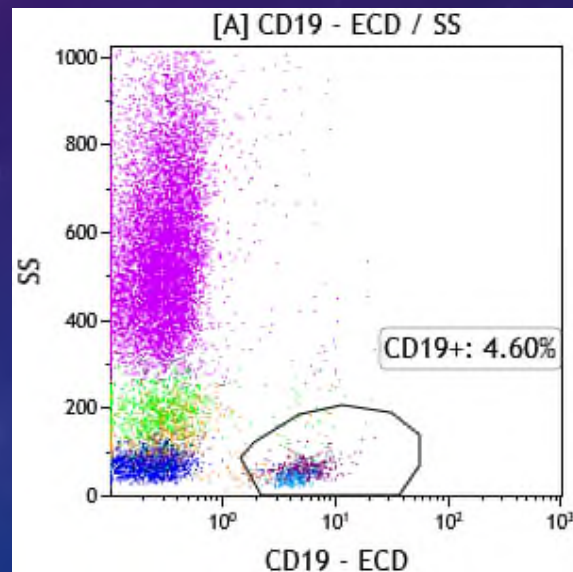
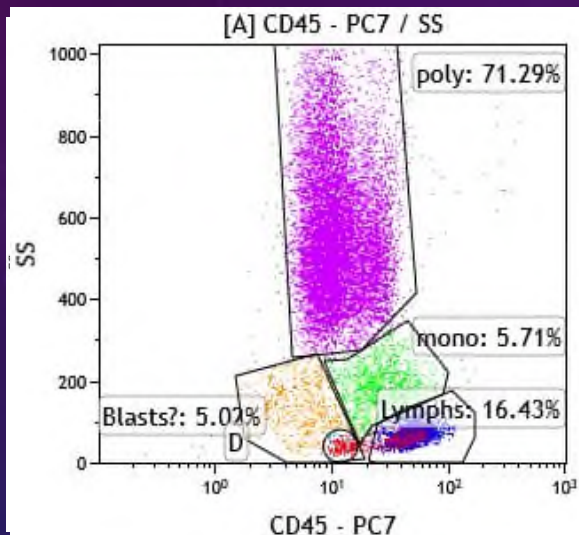
ΟΡΙΟΘΕΤΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (GATING)

Real-time vs. software

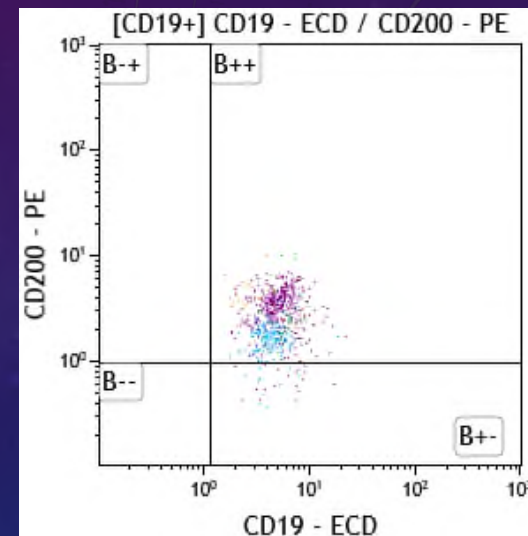


Προσδιορισμός
Ορίων θετικότητας

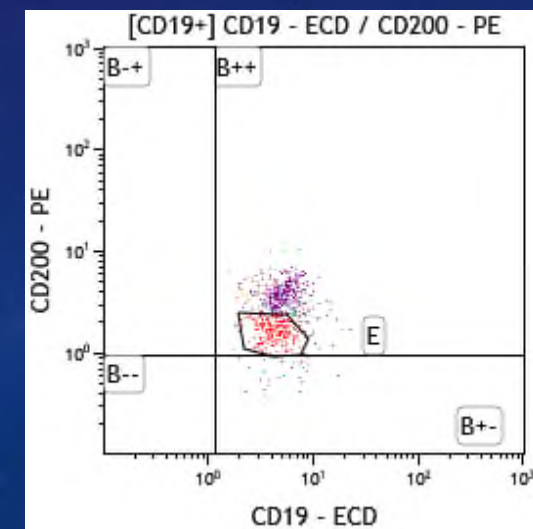
Στρατηγική οριοθέτησης



Ανάλυση



Back Gating



Εφαρμογές Κυτταρομετρίας Ροής στα Κλινικά Εργαστήρια

Γρήγορη διάγνωση

Αιματολογία: Λευχαιμία / Λεμφώματα, Μυέλωμα, ΜΔΣ, ΡΝΗ παρακολούθηση – πρόγνωση (MRD)

Ορθότερη πρόγνωση

Ανοσολογία – Πρωτοπαθείς Ανοσοανεπάρκειες
Καθ' έξιν αποβολές

Ευκολότερη απόφαση

Μεταμόσχευση : Cross match, Stem cells, Ανοσιακή αποκατάσταση

Λοιμώξεις : HIV,
Ανίχνευση παθογόνων (HPV)

Εφαρμογές Κυτταρομετρίας Ροής στα Κλινικά Εργαστήρια

Αλλεργίες

Γρήγορη διάγνωση

Έλεγχος εμβρυομητρικής αιμορραγίας

Μελέτη ΔΕΚ, Αιμοπεταλίων

Ορθότερη πρόγνωση

Ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων

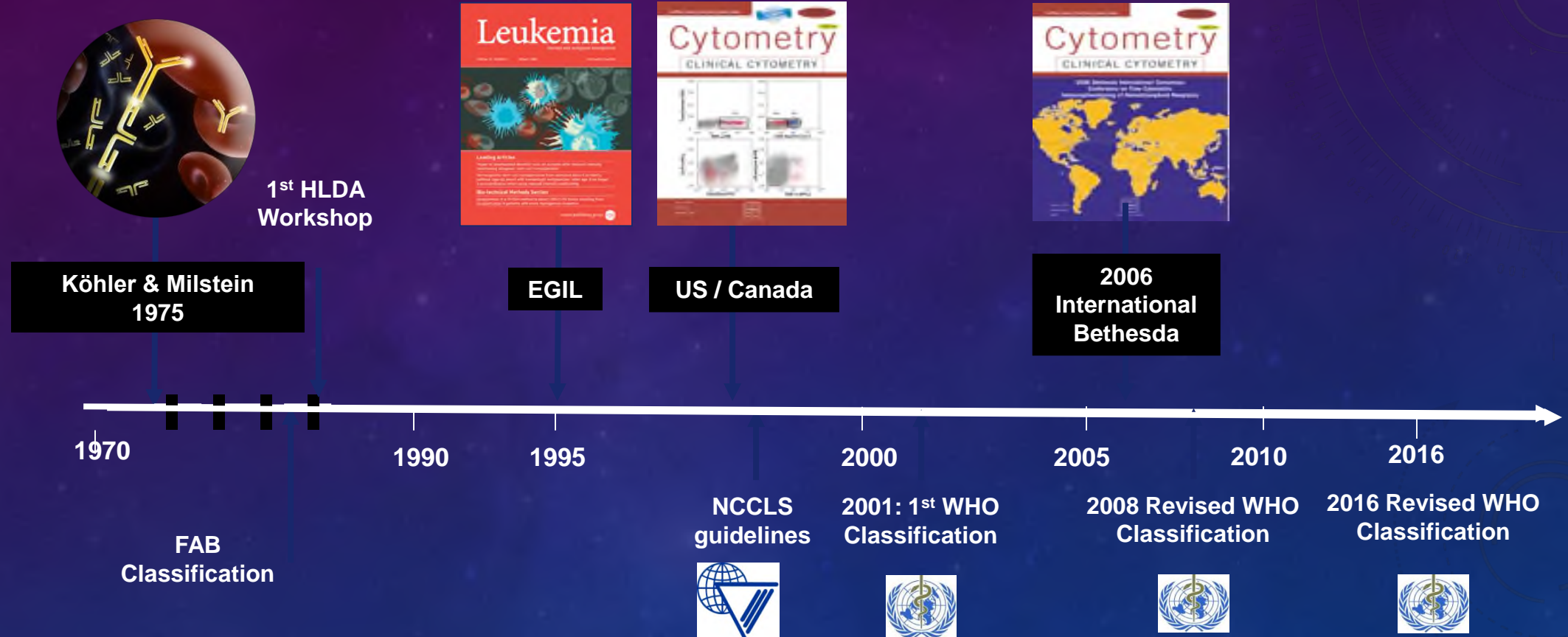
Μελέτη κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών κυττάρων

Ευκολότερη απόφαση

Μελέτη μεσεγχυματικών κυττάρων

Μελέτη γονιδιακής έκφρασης (FLOW FISH)

ΟΜΟΦΩΝΙΑ ΣΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ: ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ & ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ



Bethesda 2006 και WHO 2008

ELN , ICCS, CLSI, EuroFlow , GEIL, iBFM, ERIC κα

Στο εργαστήριο

Παραλαβή δειγμάτων (αίμα, μυελός, ΕΝΥ, πλευριτικό υγρό, υαλώδες υγρό, FNA, BAL, μοσχεύματα αιμοποιητικού)

Μέτρηση δειγμάτων εντός 24ωρου: ΕΝΥ, πλευριτικό, FNA, οξείες, CD34+ άμεσα

Κατεργασία: επώαση με αντισώματα – λύση ερυθρών – συμπύκνωση δείγματος ?

Αρχικό διερευνητικό πρωτόκολλο



- Αναγνώριση τυχόν βλαστικού πληθυσμού
- Ταυτοποίηση της σειράς Β, Τ ή ΝΚ λεμφοϋπερπλασίες, έλεγχος κλωνικότητας
- Κυτταροπενικά δείγματα?? Αρκεί ο απλός φαινότυπος ?

Εξειδικευμένο πρωτόκολλο

Τυποποίηση οξείας λευχαιμίας, λεμφωμάτων
Καθορισμός ωρίμανσης
Εύρεση LAIPs (Leukemia Associated ImmunoPhenotypes)

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

A) ΑΠΛΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ και HIV

Απλός Φαινότυπος : Προσδιορισμός T, B και NK κυττάρων στα λεμφοκύτταρα

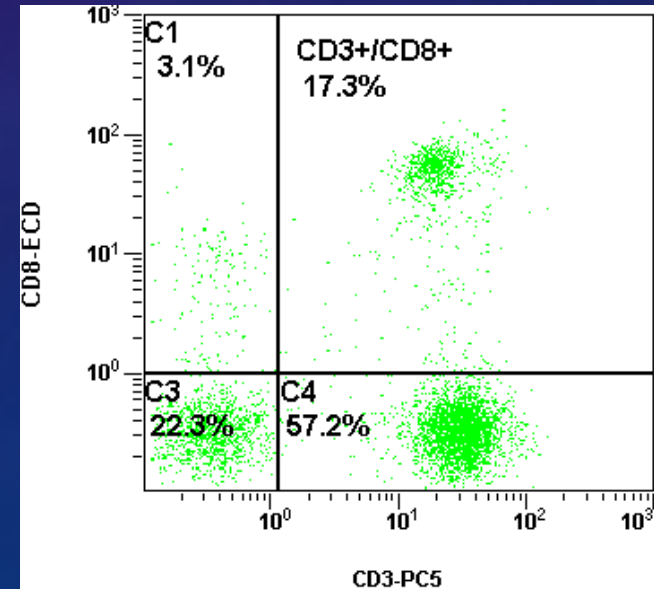
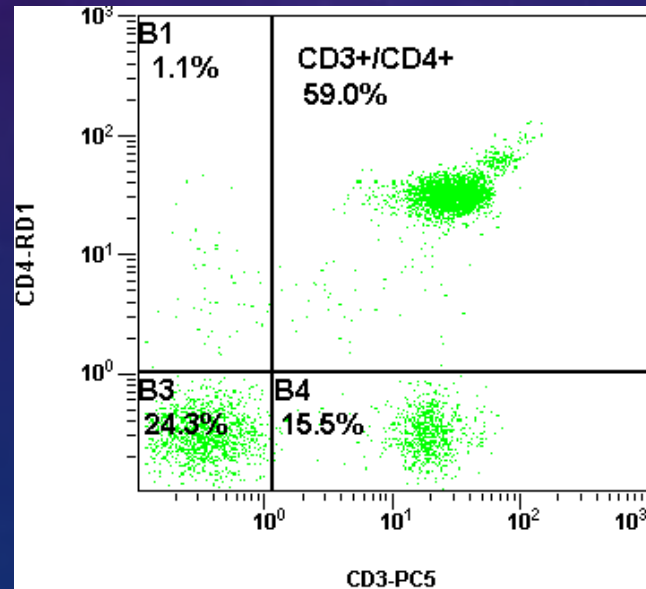
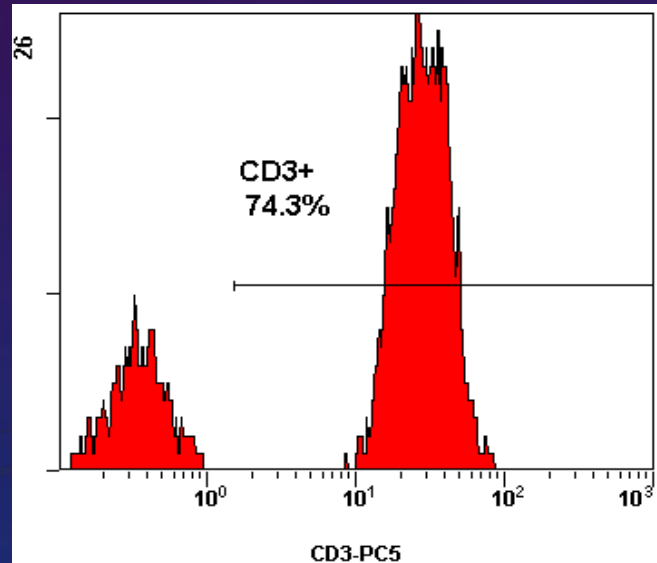
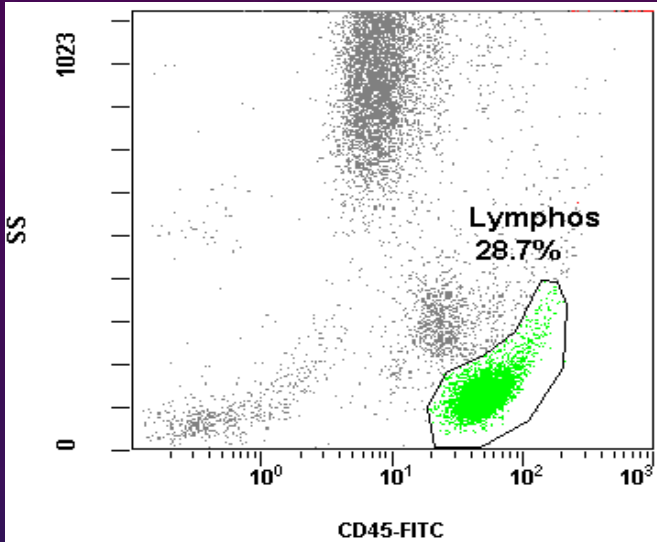
T ΚΥΤΤΑΡΩΝ : CD3, CD4, CD8

B : CD19

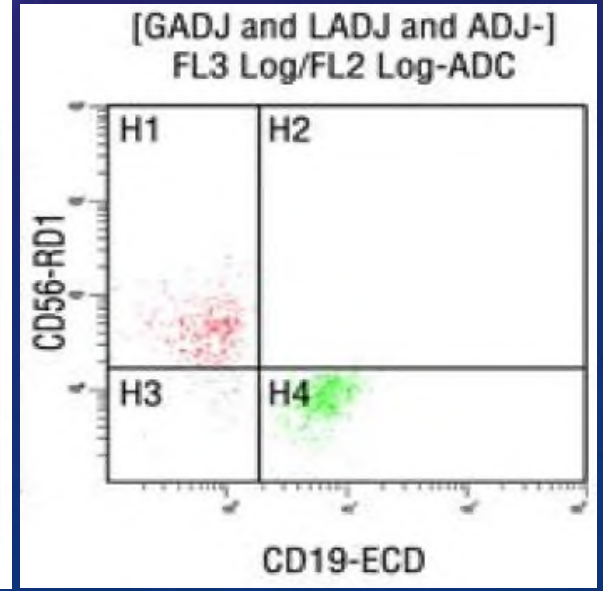
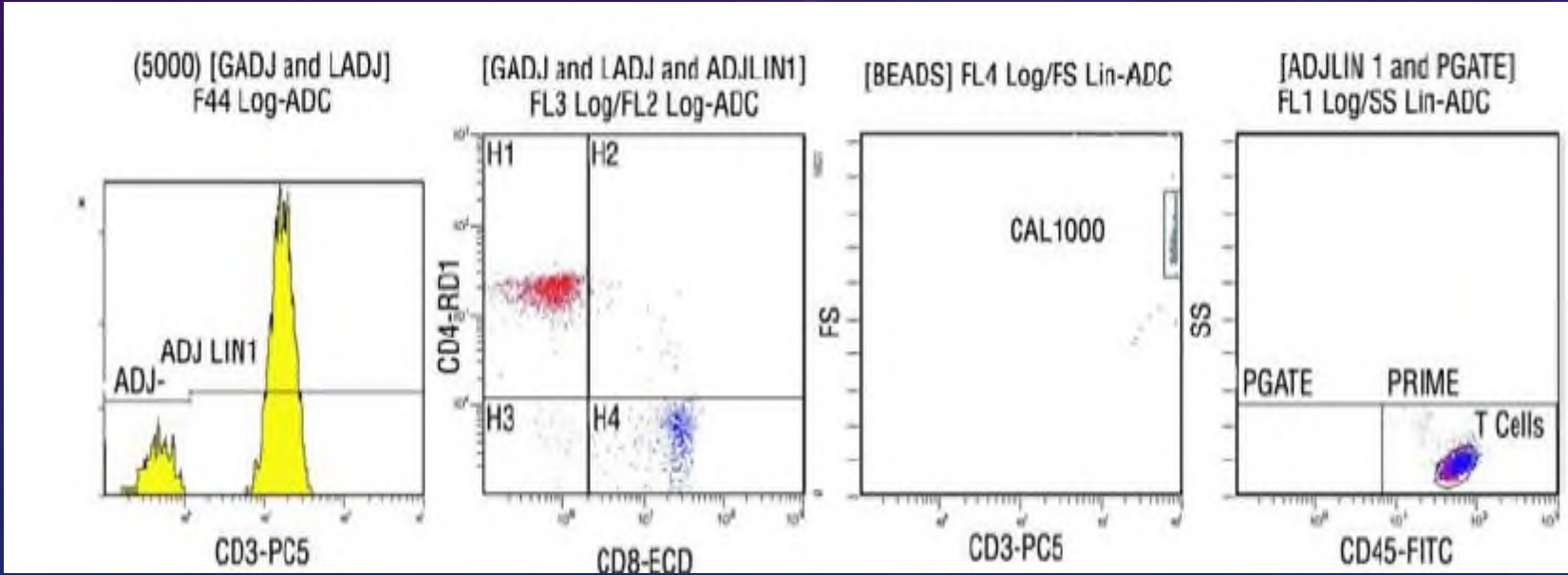
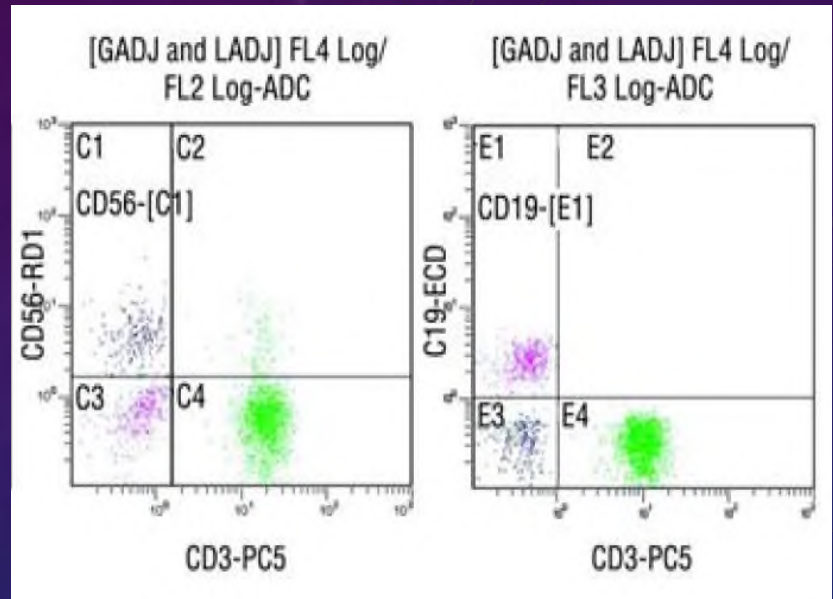
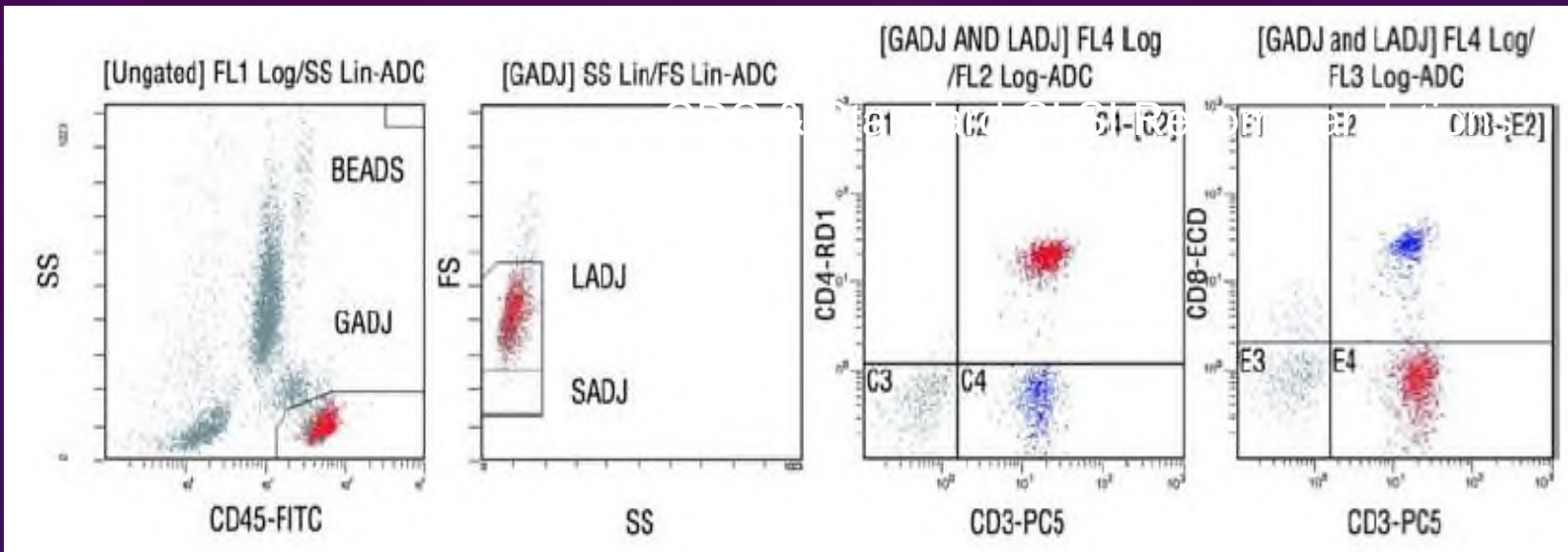
NK : CD16, CD56

Το άθροισμα T+B+NK= 100%
λεμφοκυττάρων $\pm 5\%$

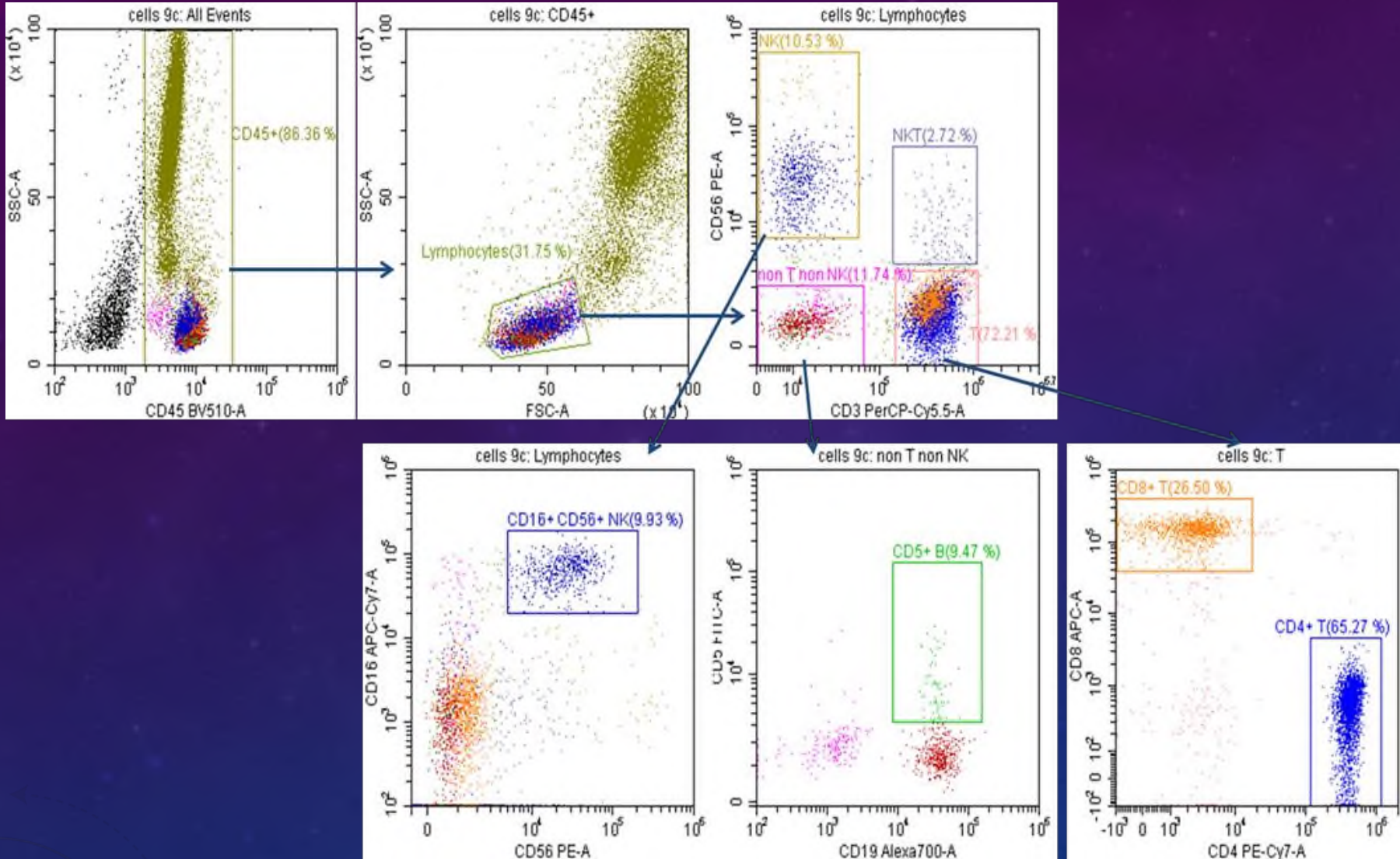
CD45 (Παν-λευκοκυτταρικό)



Αυτόματο πρωτόκολλο - tetraONE-Kit & TetraCXP (HIV)



ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ



- CD 45+
- CD 16 +
- CD56 +
- CD3 +
- CD 5 +
- CD 8 +
- CD4 +
- CD19 +

Analysis of the human control leukocyte cells clearly demonstrates expected populations of (T cells, NKT cells, NK cells, and B cells).

*Data
provided by
BC Miami
R&D*

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

B) ΛΕΜΦΟΎΠΕΡΠΛΑΣΙΕΣ

Ενδεικτικά διερευνητικά πρωτόκολλα για λεμφοϋπερπλασίες (ποια η σειρά προέλευσης των παθολογικών κυττάρων T ή B ή NK?)

CD2 – CD19 – CD45

CD3 – CD19 – CD45

Έλεγχος κλωνικότητας κ, λ αλυσίδων

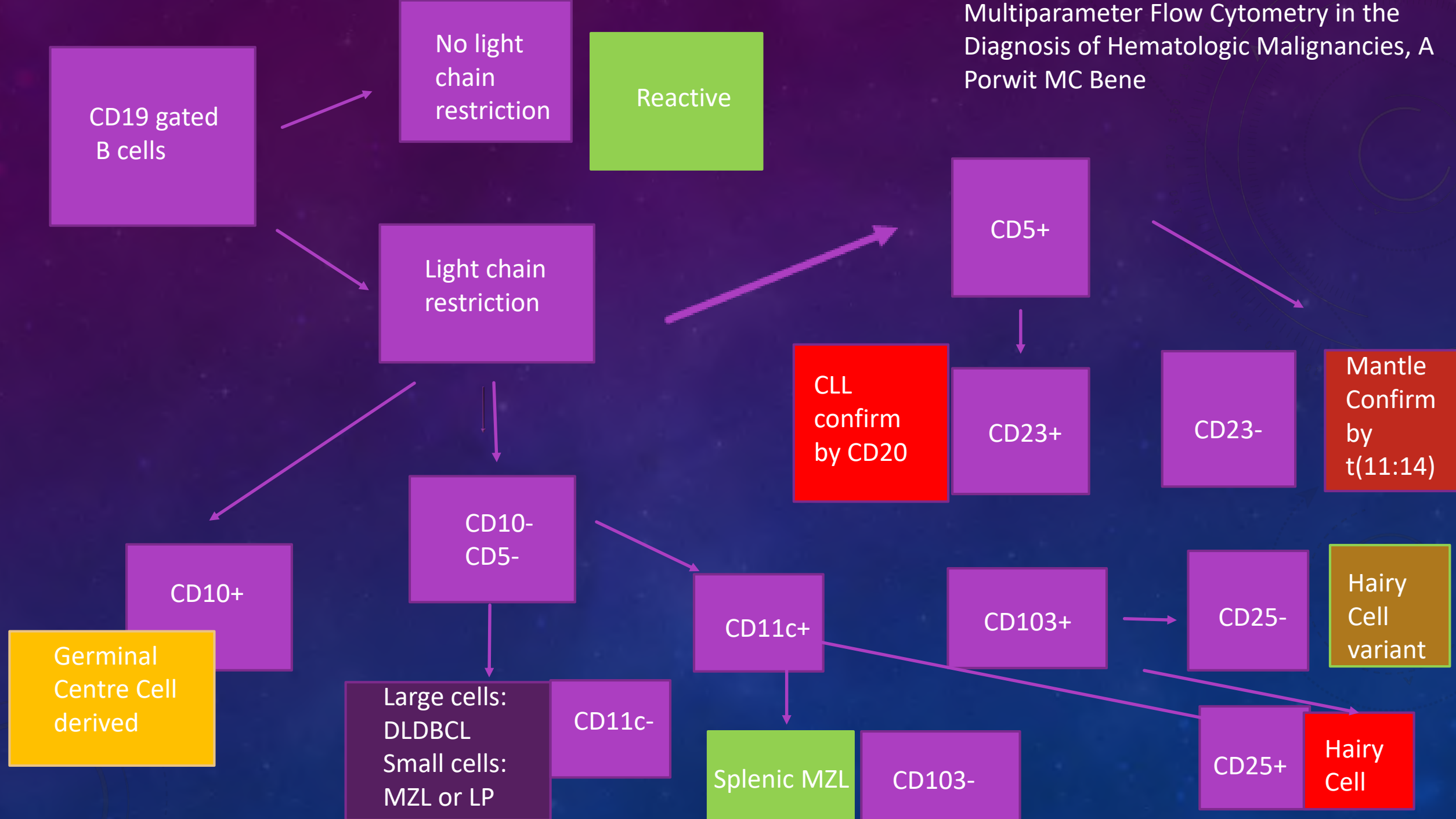
Γενικότερα διερευνητικά πρωτόκολλα

CD45, DR, CD3, CD5, CD4, CD8, CD19, CD10, CD20, CD22, κ, λ

CD45, DR, CD3, CD5, CD4, CD8, CD19, CD10, CD20, CD34, CD56, κ, λ

Πλήρης έλεγχος B : CD19, CD10, CD20, CD22, ROR1, FMC7, CD43, CD23, CD5, CD79b, CD200, CD38, CD25, CD11c, CD103 κ, λ, CD45 (δείκτες επιφανείας)

Multiparameter Flow Cytometry in the Diagnosis of Hematologic Malignancies, A Porwit MC Bene



CD19 gated B cells

No light chain restriction

Reactive

Light chain restriction

CD5+

CD23+

CLL confirm by CD20

CD23-

Mantle Confirm by t(11:14)

CD10+

Germinal Centre Cell derived

CD10- CD5-

Large cells: DLDBCL
Small cells: MZL or LP

CD11c-

CD11c+

Splenic MZL

CD103+

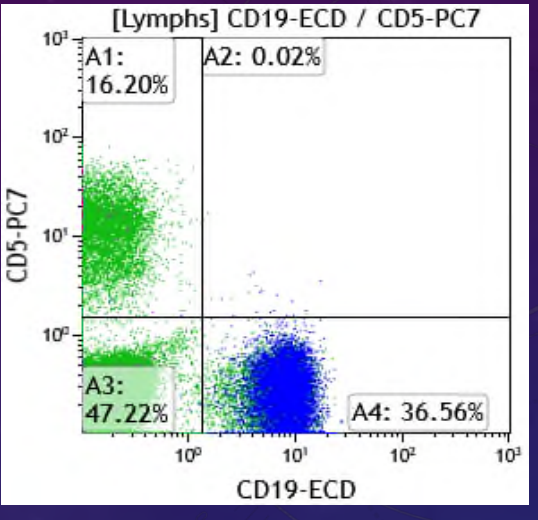
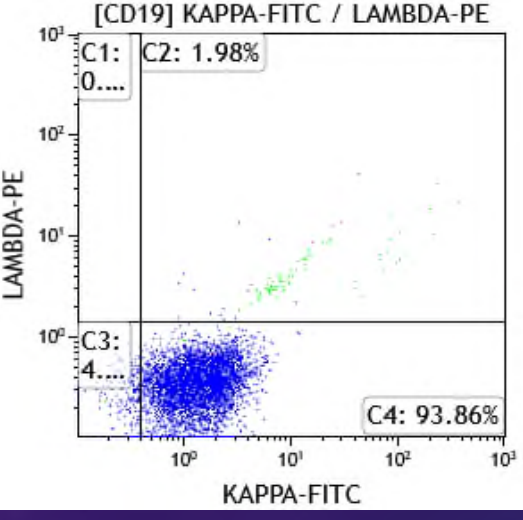
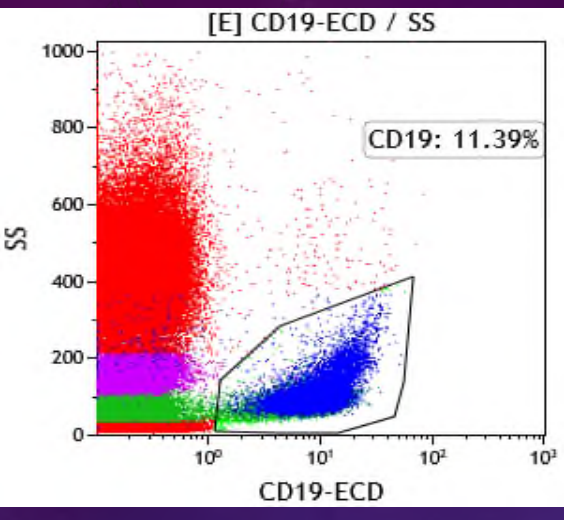
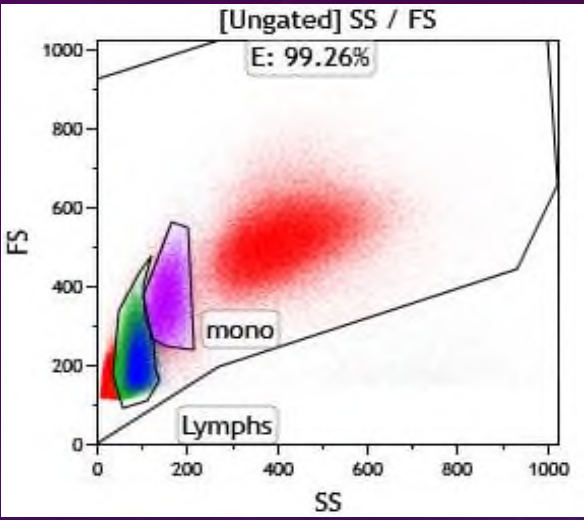
CD103-

CD25-

Hairy Cell variant

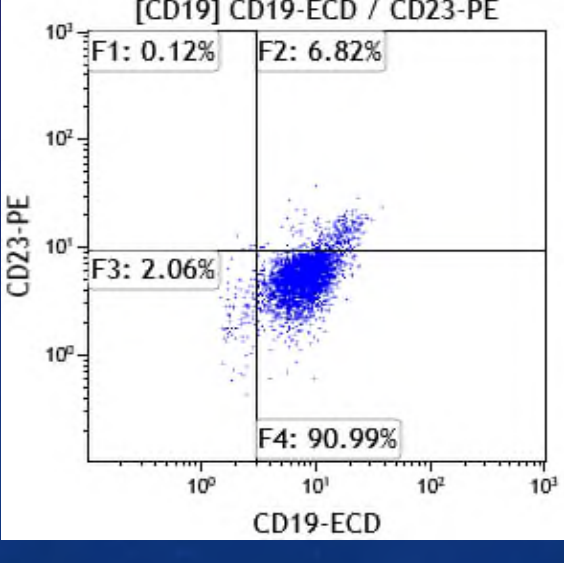
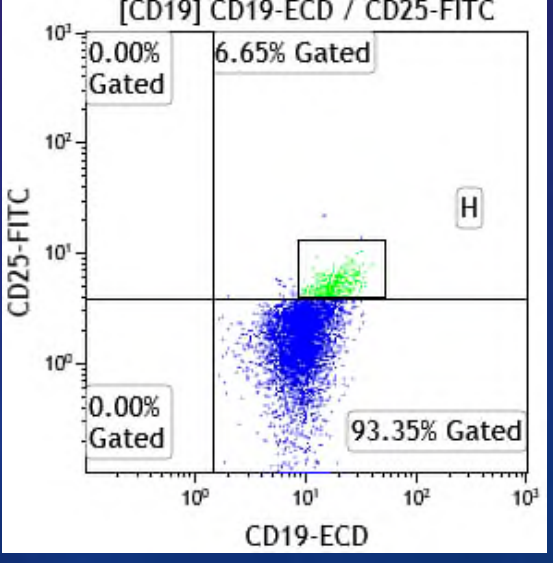
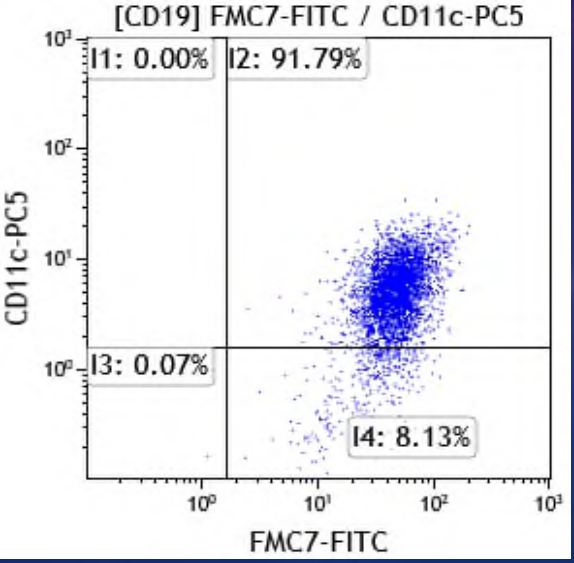
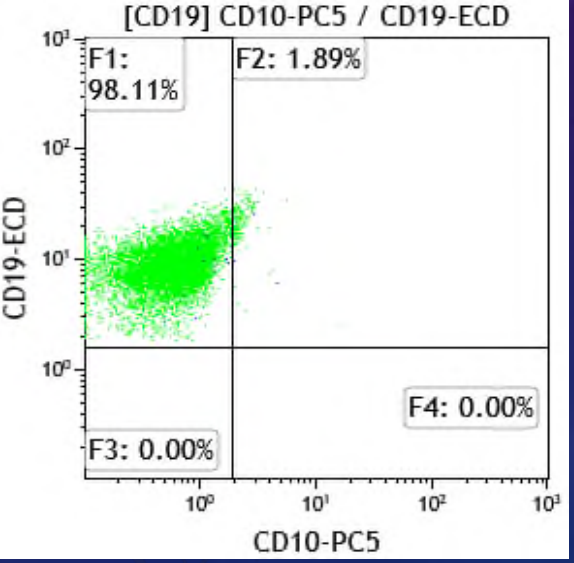
CD25+

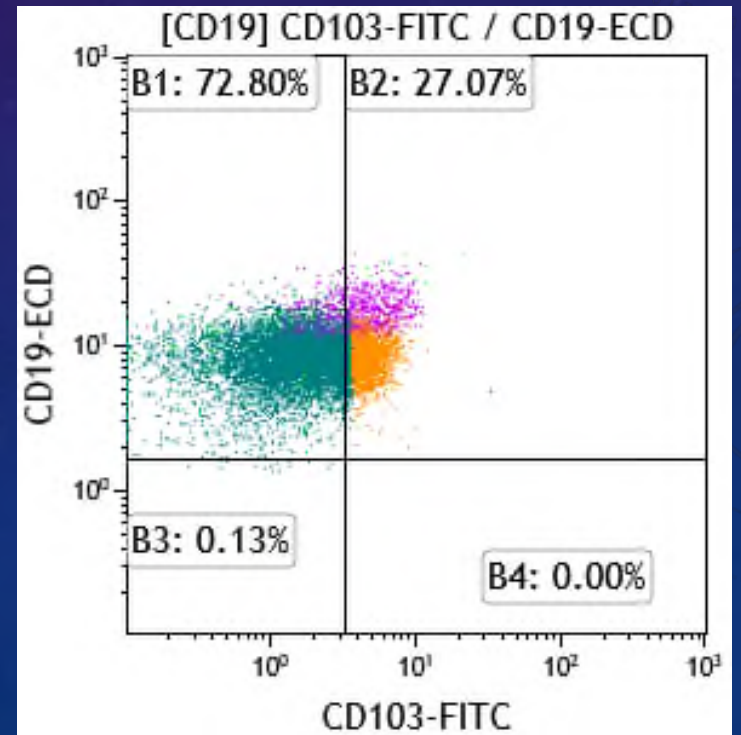
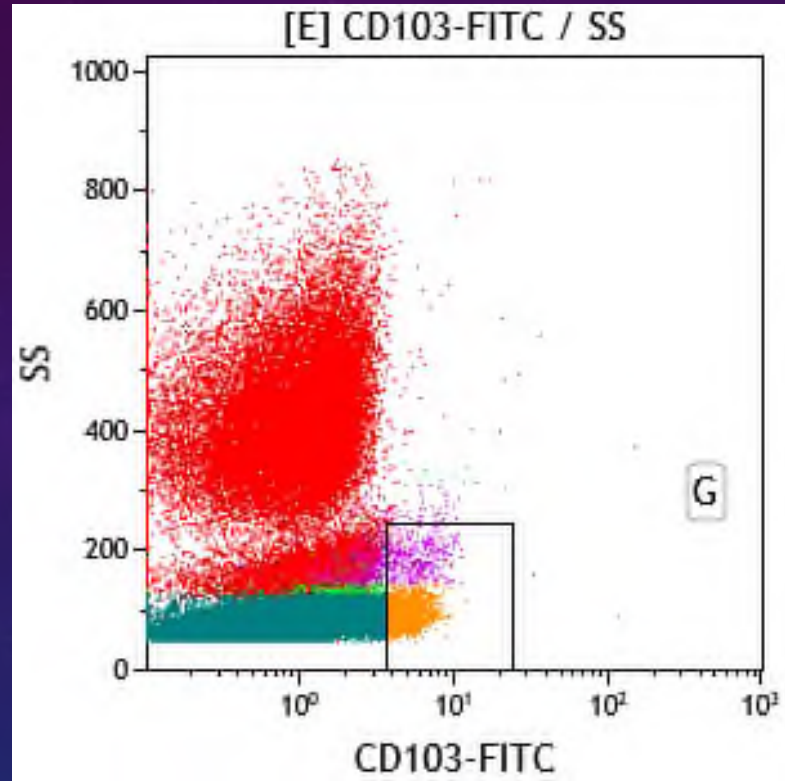
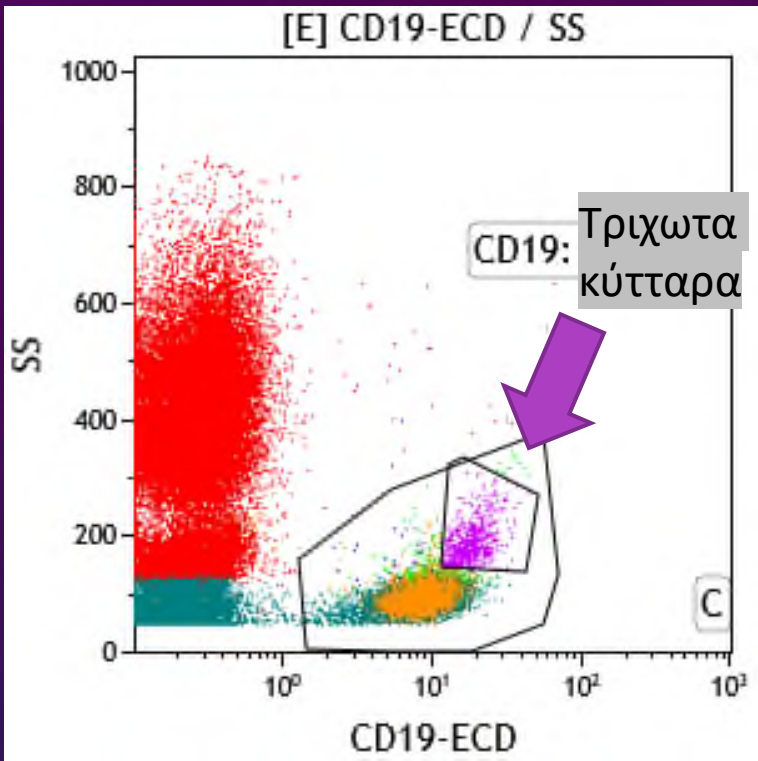
Hairy Cell



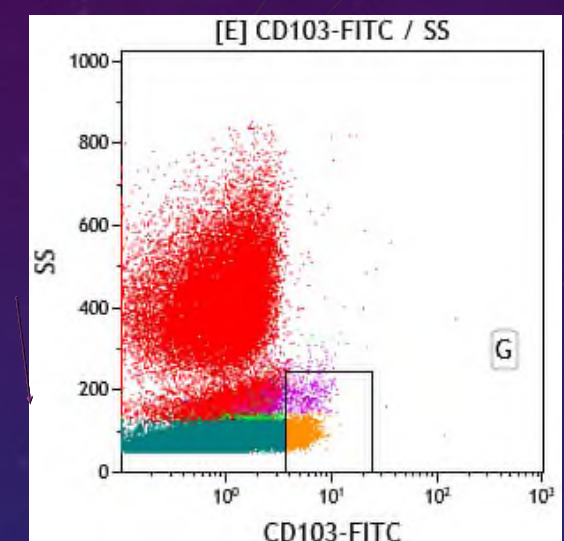
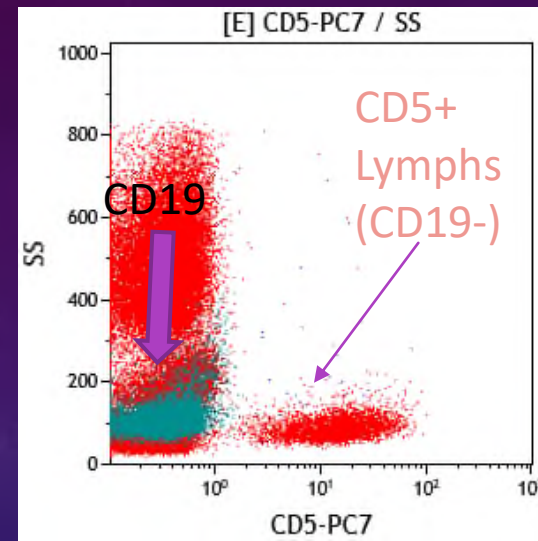
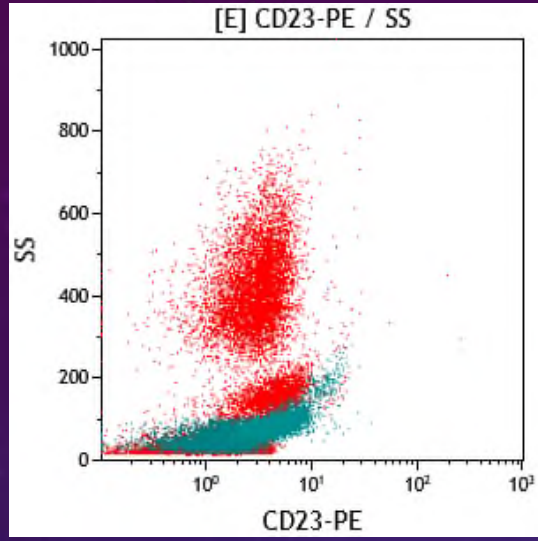
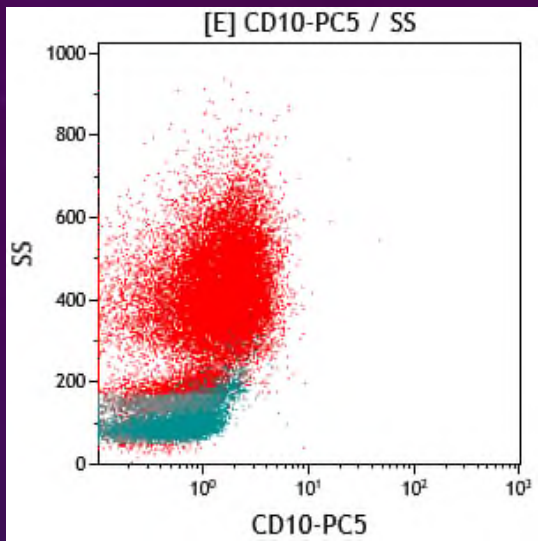
ΑΝΑΛΥΣΗ Β -ΛΕΜΦΟΪΠΕΡΠΛΑΣΙΑΣ

Τριχωτή Λευχαιμία?

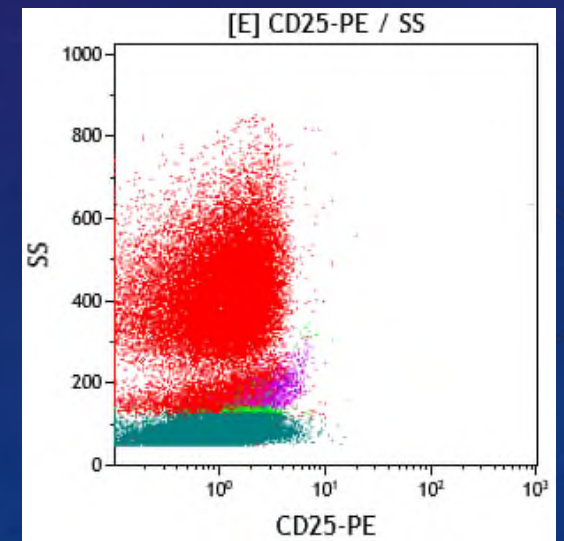
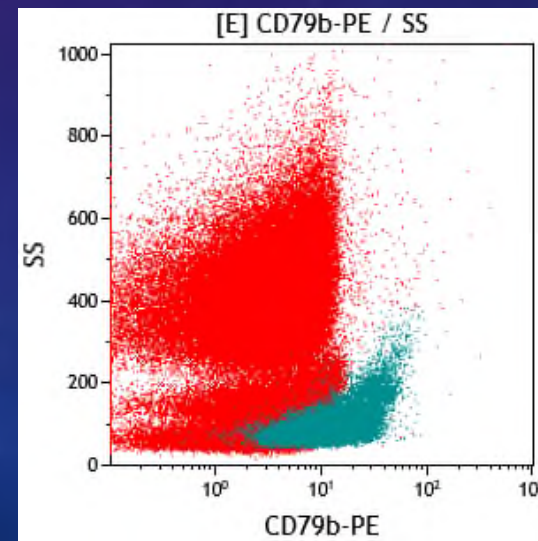
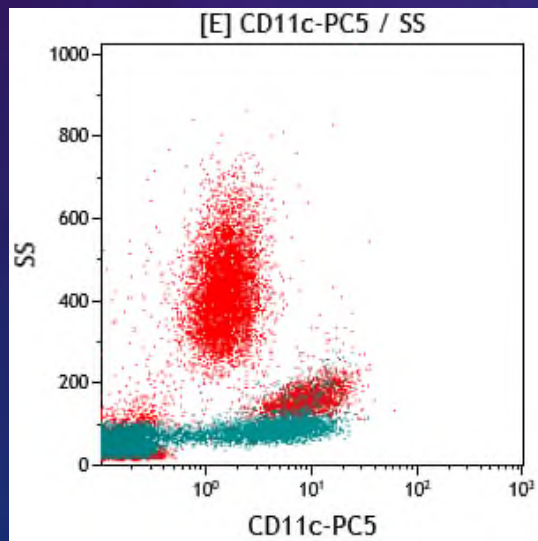
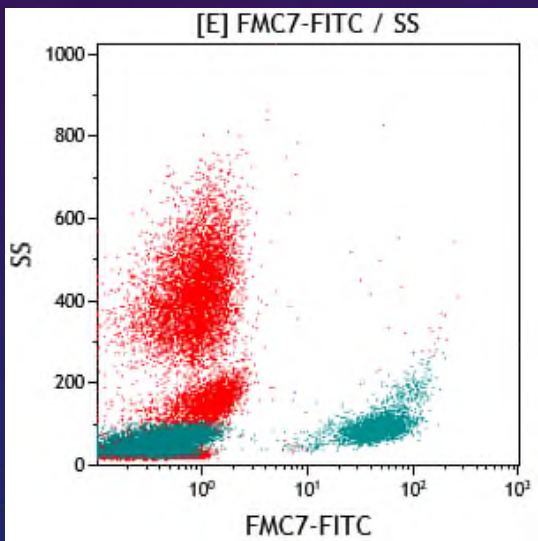




ΤΡΙΧΩΤΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ,
ΕΚΦΡΑΣΗ CD103+



Εκτίμηση ορίων θετικότητας με βάση το συνδυασμό SS/FL



Το υαλώδες υγρό ως δείγμα στην κυτταρομετρία ροής

VITREOUS AND AQUEOUS FLUID FLOW CYTOMETRY IN THE DIAGNOSIS OF OCULAR LYMPHOMA FOURTEEN YEARS OF EXPERIENCE

G. Paterakis, T. Papadaki, Markomichelakis N, P. Vasileiou

Βραβείο ESCCA

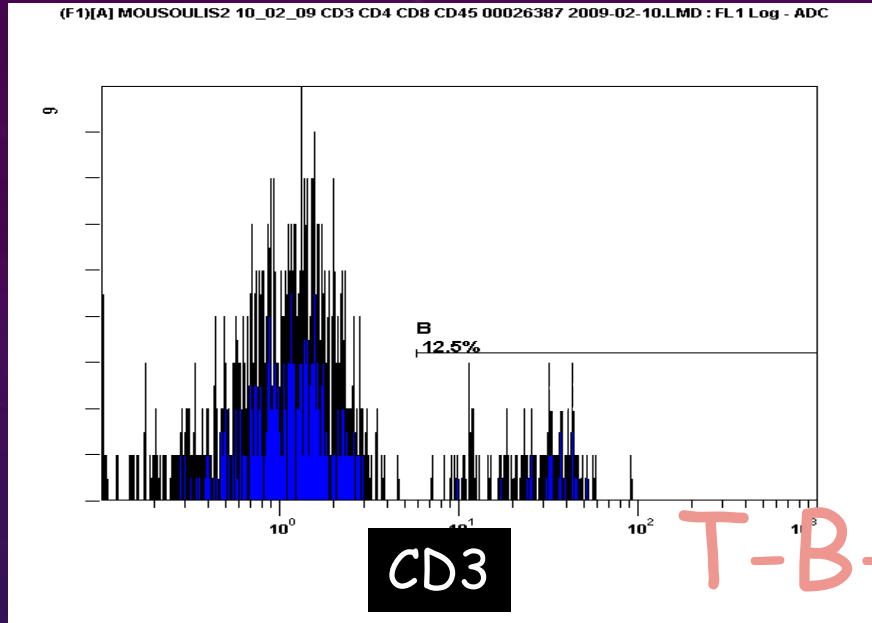
- Flow cytometry of VF/AF has to adjust to a **short and fragile sample** and face a **high noise to signal ratio**
- It is still considered an **ancillary** method to cytology, however it provides objective measurements leading to lymphoma verification
- PPV is an established and safe method to provide diagnostic material for PIOL. **A negative AF** is the rule for DLBCL PIOLs
- FC aims at scatter, clonality, phenotype and mitotic index measurements in order to **ensure diagnosis**

Flow cytometry proved sensitive and specific

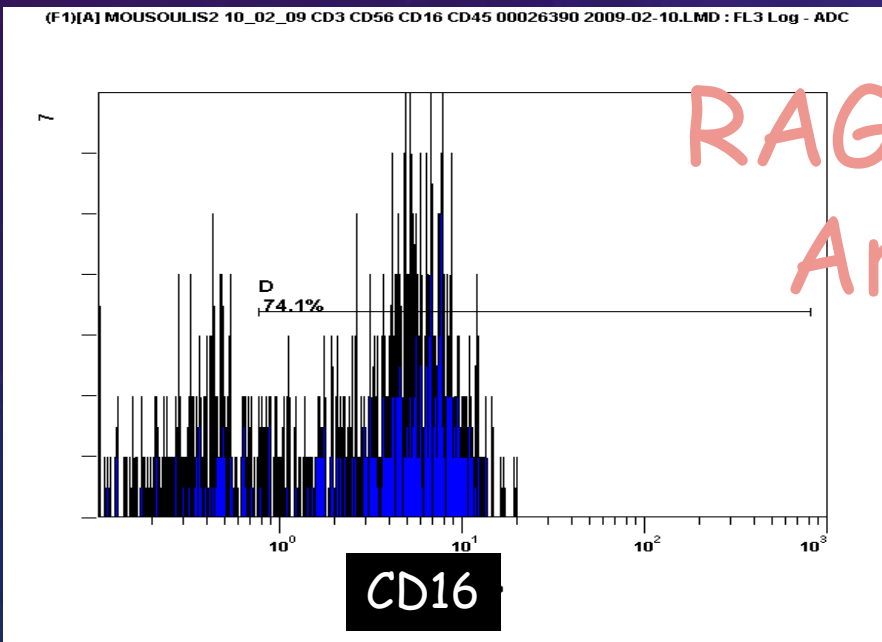
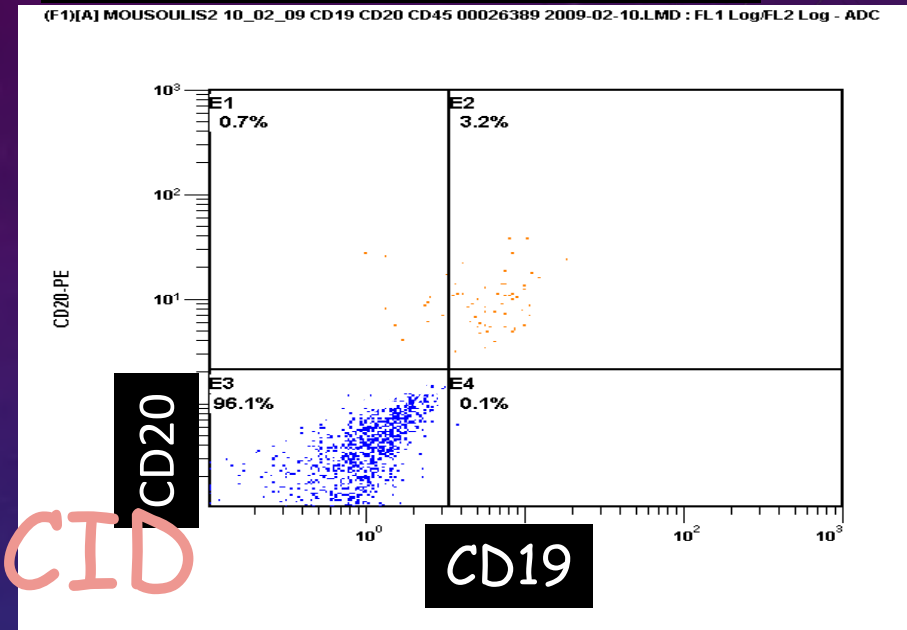
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Γ) ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

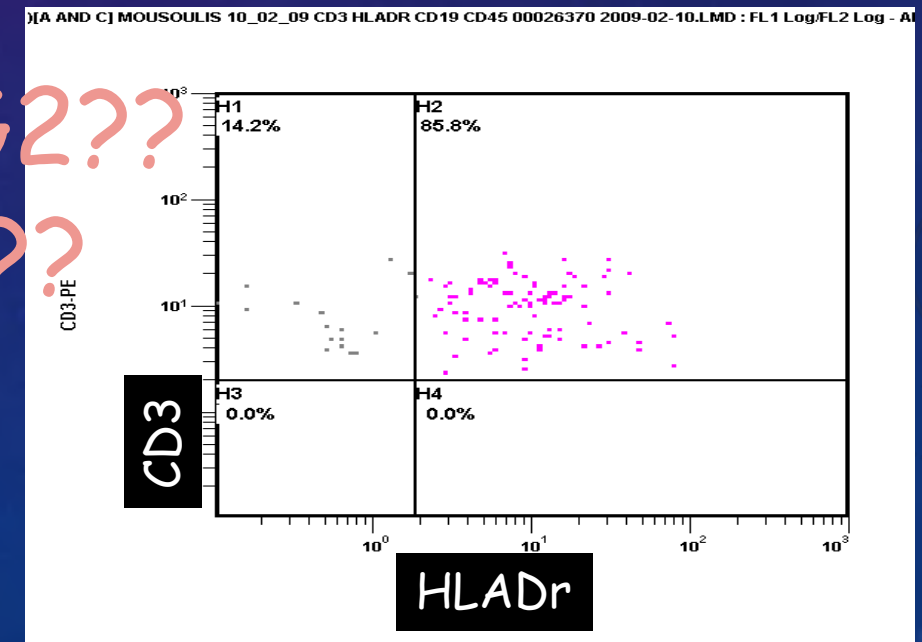
Η κυτταρομετρία ροής στην ανοσοανεπάρκεια



T-B-NK+ SCID



RAG1/RAG2??
Artemis??

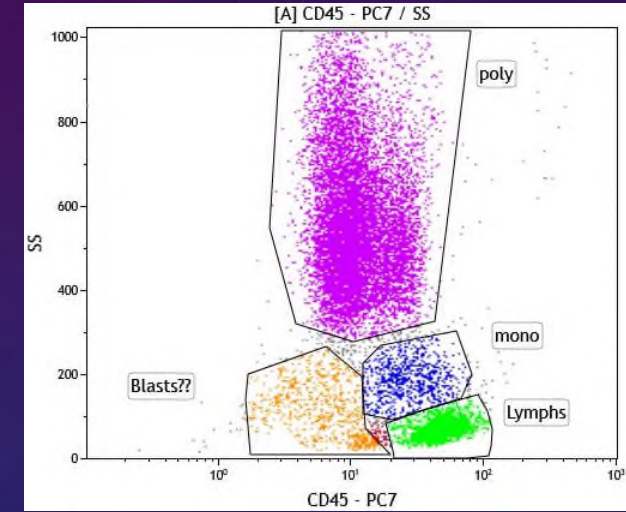


ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

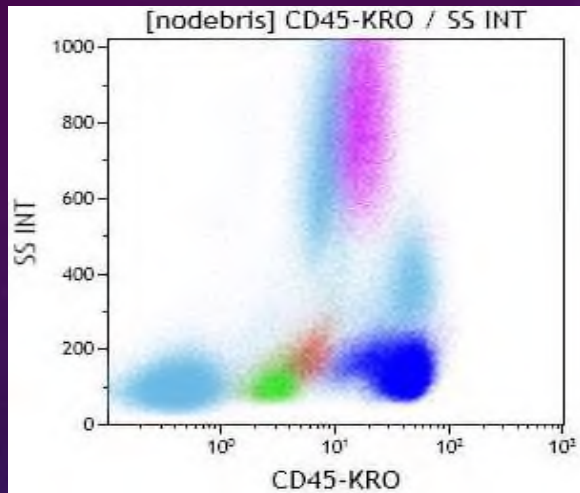
Δ) ΟΞΕΙΑ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Η κυτταρομετρία ροής στην οξεία λευχαιμία (ΟΛ)

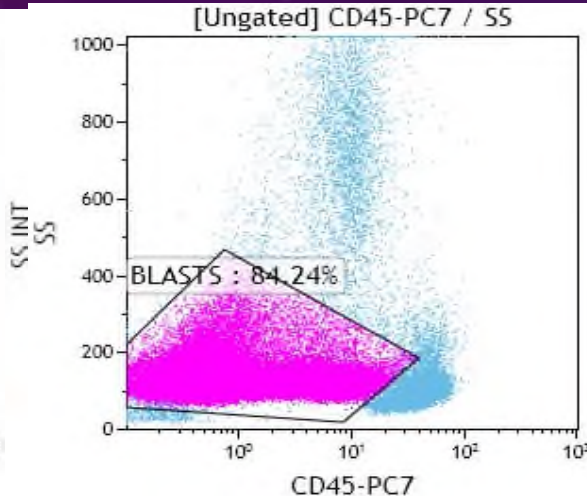
- Προσδιορισμός βλαστών SS/CD45, κύτταρα με ασθενή έκφραση CD45, οριοθέτηση και ποσοστό
- Τυποποίηση : τι δείκτες εκφράζουν? Ποιας σειράς? (μυελικής, λεμφικής, ερυθράς, μεγακαρυωτικής?)
- Έλεγχος δεικτών ωρίμανσης, επιφάνεια και κυτταροπλασματικά
- Ταξινόμηση ΟΛ (FAB, EGIL, WHO)
- Πρόγνωση ?



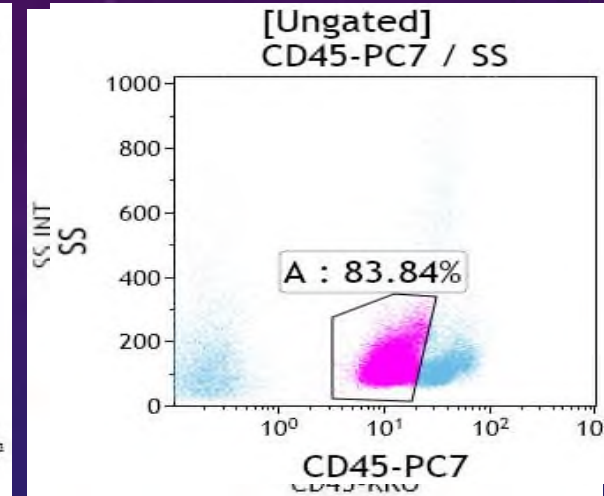
Αναγνώριση παθολογικού βλαστικού πληθυσμού



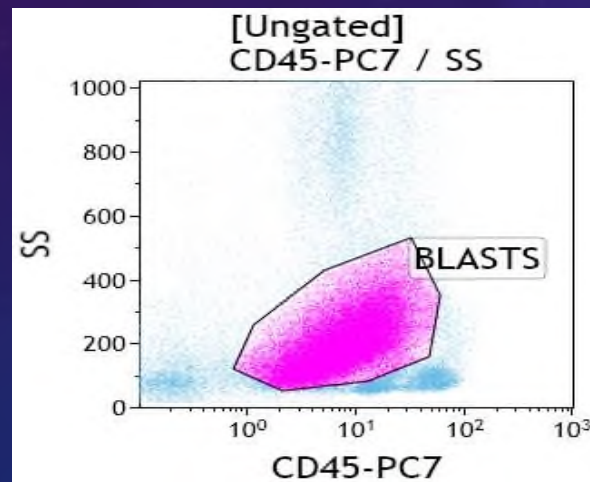
Φυσιολογικός Μυελός των Οστών



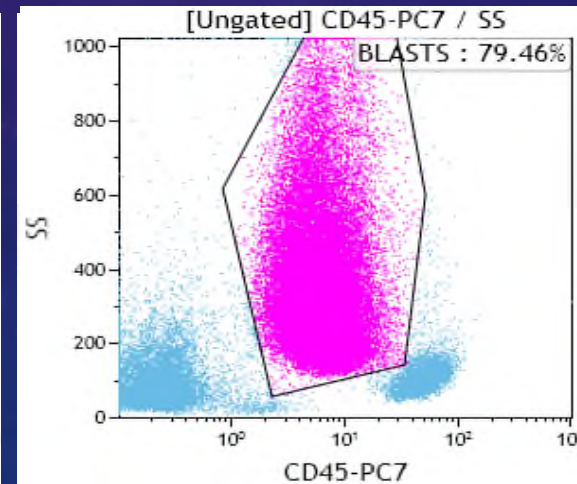
Συνήθης θέση Β ΟΜΛ



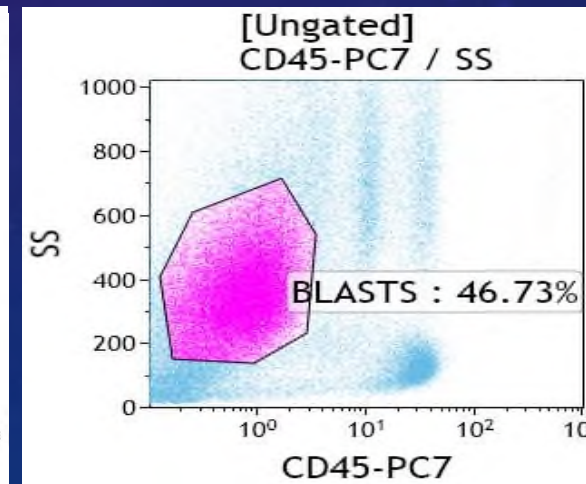
Συνήθης θέση Τ ΟΜΛ



Συνήθης θέση ΟΜΛ Μ0-Μ2, Μ4



Συνήθης θέση ΟΜΛ Μ3



Συνήθης θέση μη αιματολογικών κακοηθειών και ΟΜΛ Μ6-Μ7

Έκφραση 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-ΟΛΛ

- **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**

Καθορισμός Βαθμού Ωρίμανσης Ταξινόμηση ΟΜΛ

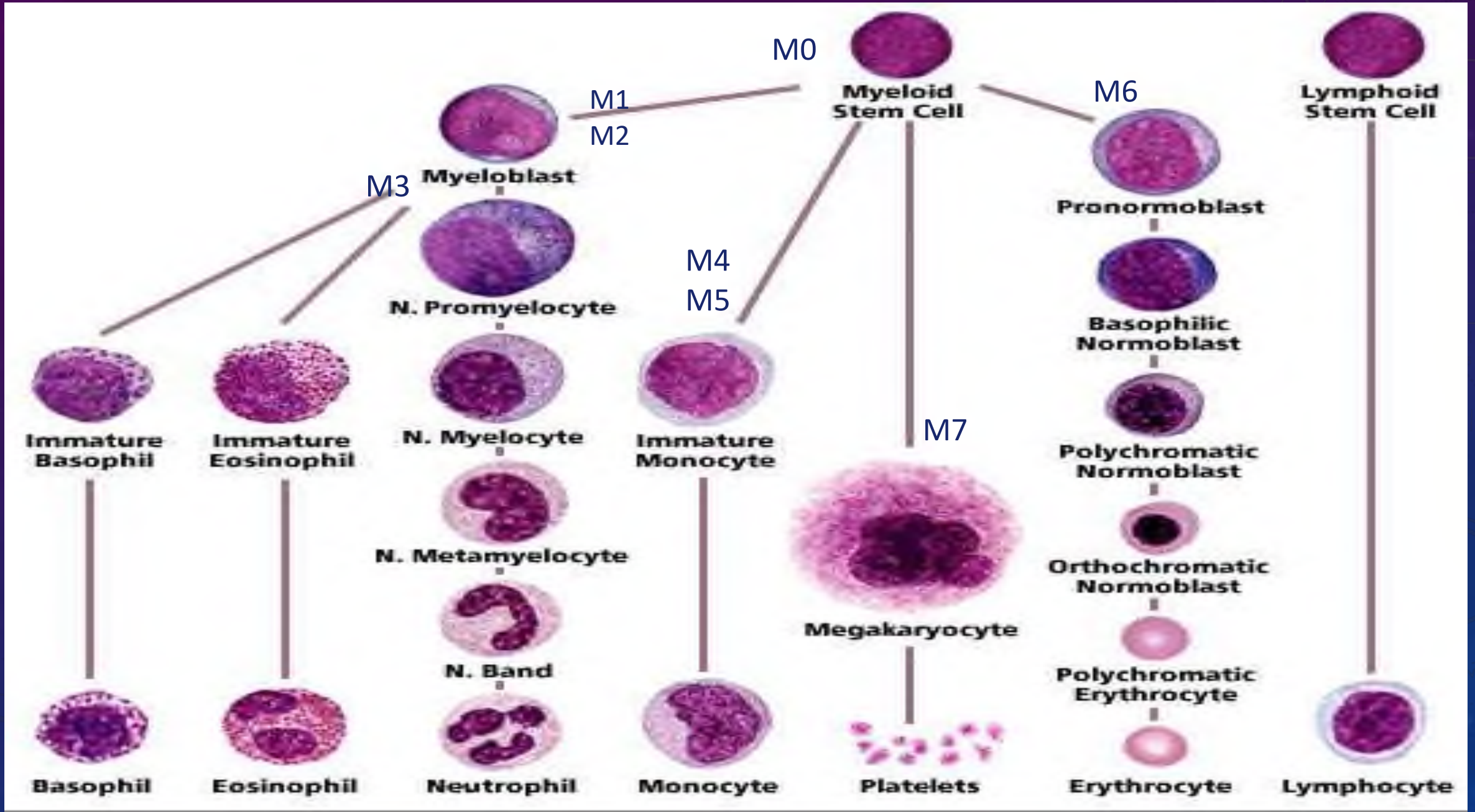
Κατά FAB

Συνήθης Ανοσοφαινότυπος

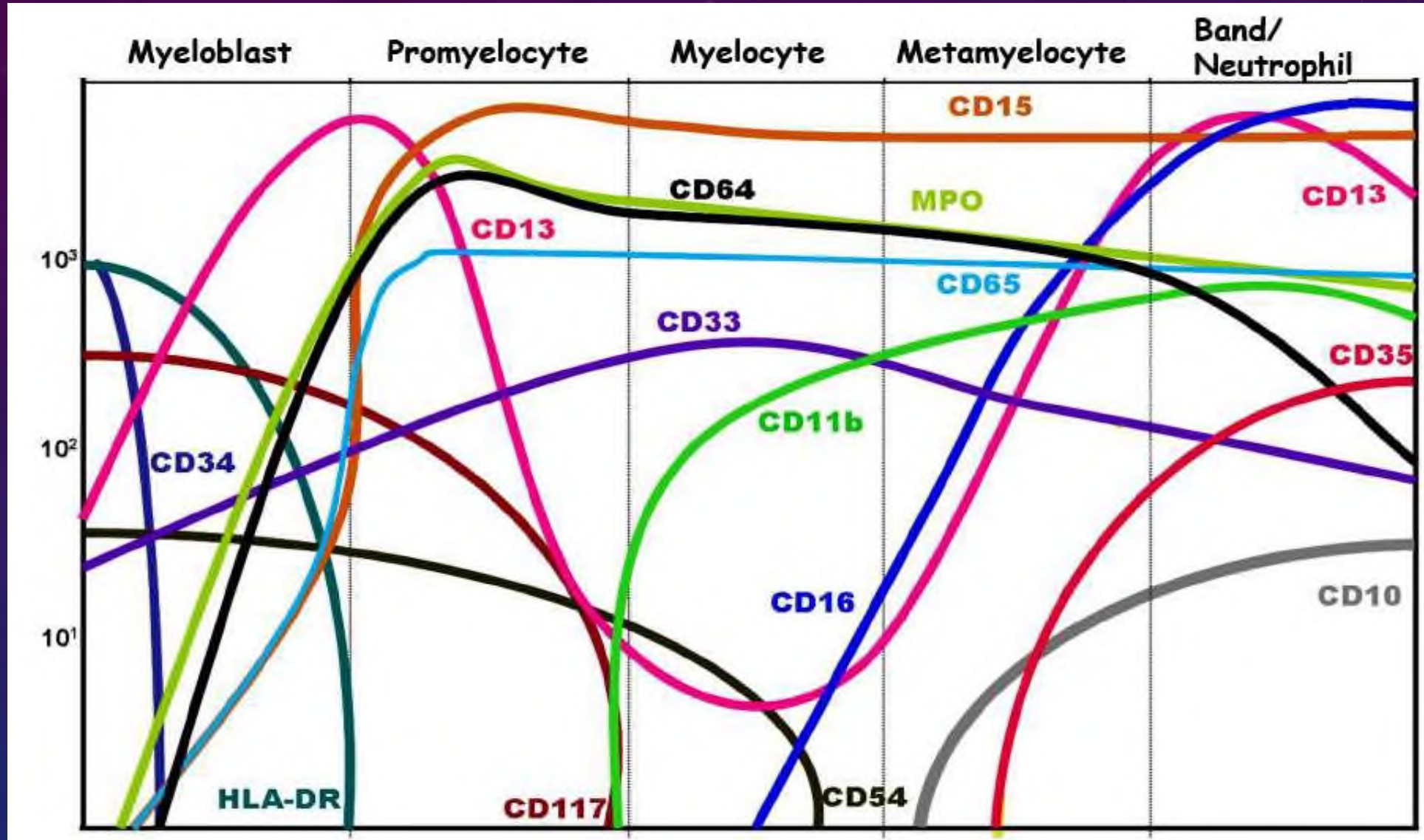
M0	ΟΜΛ με ελάχιστη διαφοροποίηση	MPO- CD34+ CD133+ CD13+ CD33+ HLADR+
M1	ΟΜΛ χωρίς ωρίμανση	MPO+ CD34+/- CD117+ CD13+ CD33+
M2	ΟΜΛ με ωρίμανση	MPO+ CD34+/- CD117+/- CD13+ CD33+ CD15+ CD11b+
M3	Προμυελοκυτταρική Λευχαιμία	MPO+++ CD33+++ HLADR- CD34- CD15- CD11b- (CD2+ σε variant μικροκοκκιώδη μορφή)
M4	Οξεία Μυελομονοκυτταρική	Σαν M2 + 20% μονοβλαστών (CD64+++ , CD4+ , CD11c+).
M5	Οξεία Μονοκυτταρική	CD64+++ , CD4 , CD11b++ , CD11c+ , HLADR++ , CD36+ , CD14+/-
M6	Οξεία ερυθρολευχαιμία	>50% CD34+ CD117+ CD71+++ CD235+
M7	Οξεία Μεγακαρυοβλαστική	CD34+ CD117+ cCD41+ cCD61+ CD42

ΌΧΙ πάντα απόλυτη συσχέτιση!!

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ FAB, ΒΑΣΙΖΕΤΑΙ ΚΥΡΙΩΣ ΣΤΗΝ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΕΙΑ

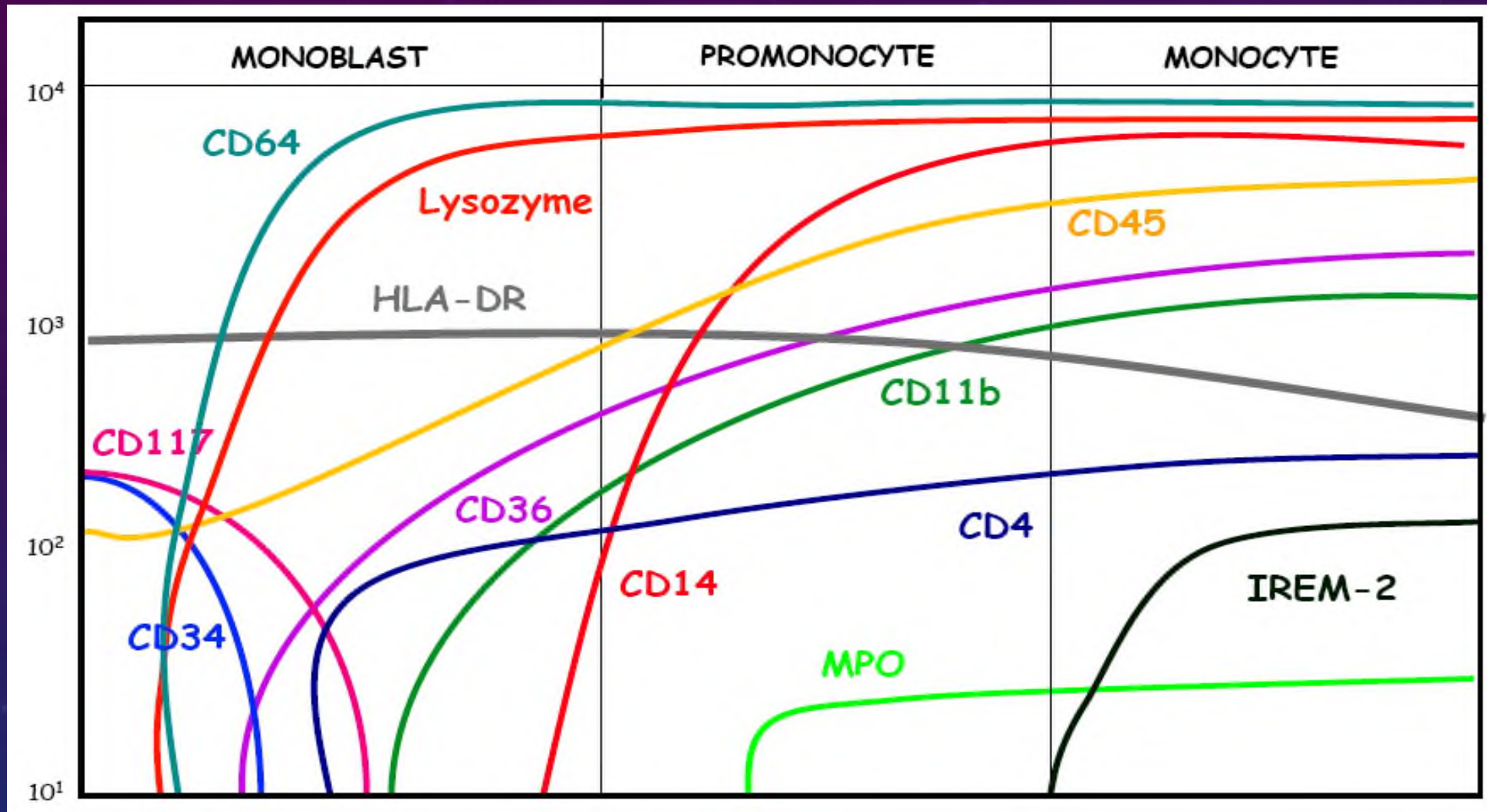


Δείκτες κατά την φυσιολογική διαφοροποίηση της μυελικής σειράς



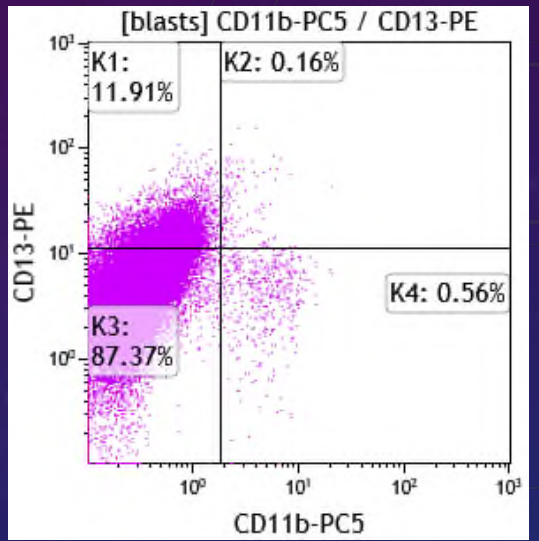
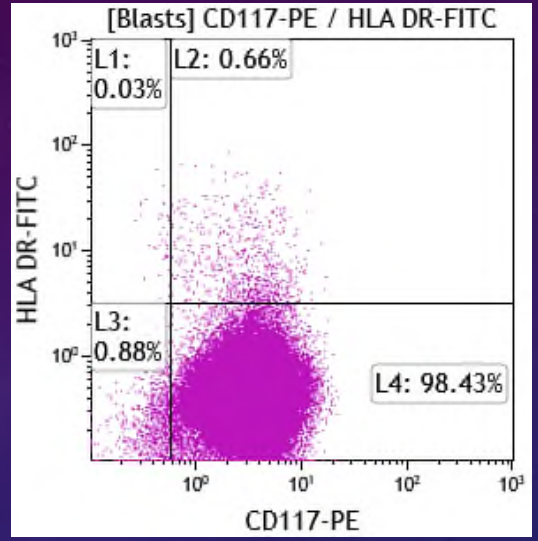
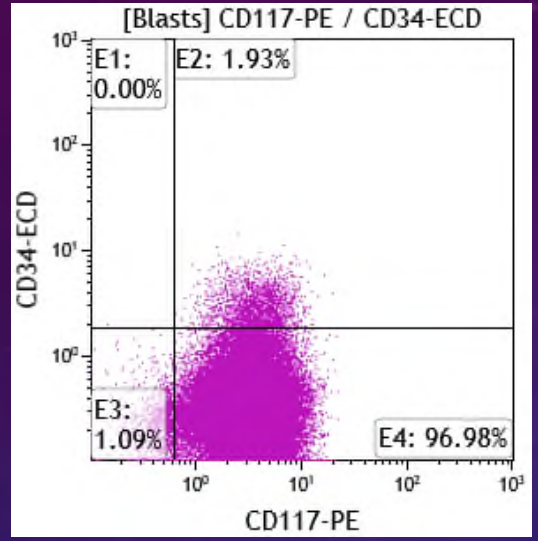
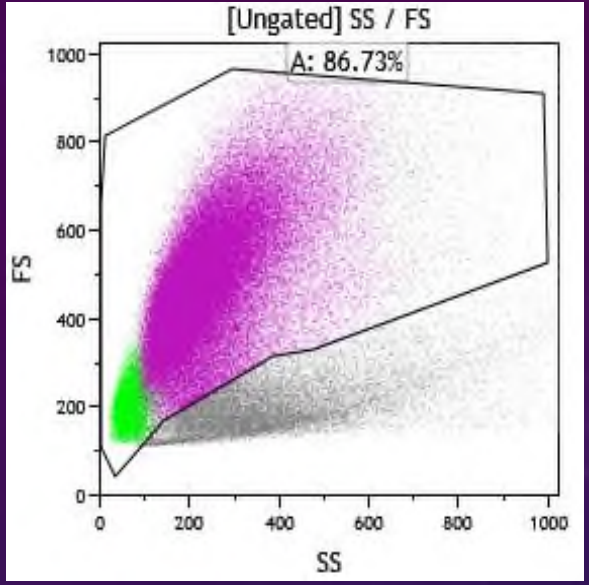
Καθορισμός Βαθμού Ωρίμανσης

Δείκτες κατά την φυσιολογική διαφοροποίηση της μονοκυτταρικής σειράς

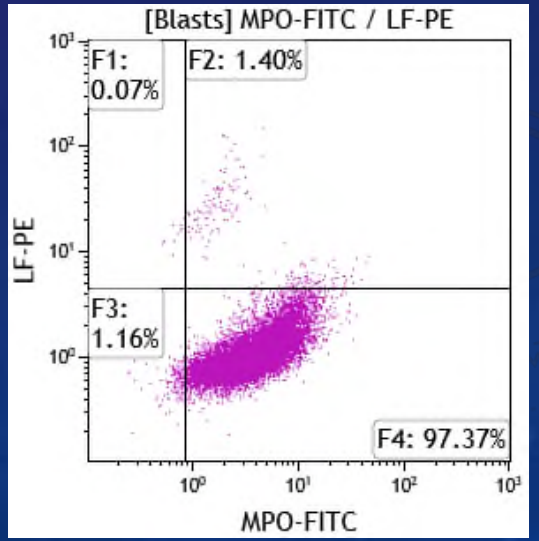
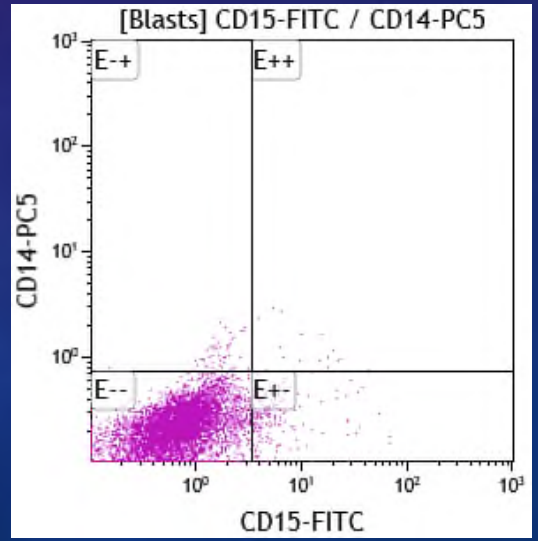
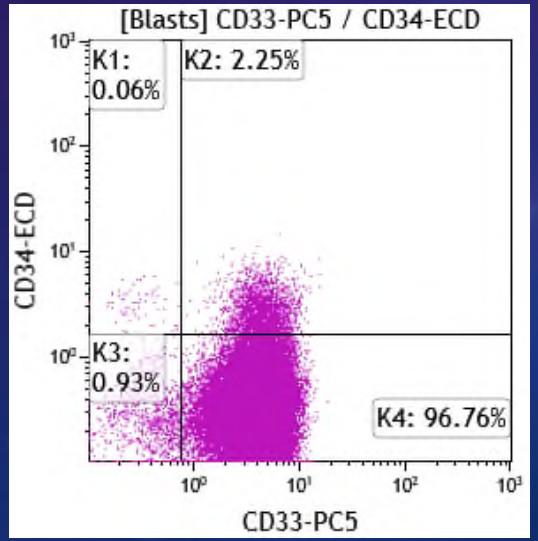
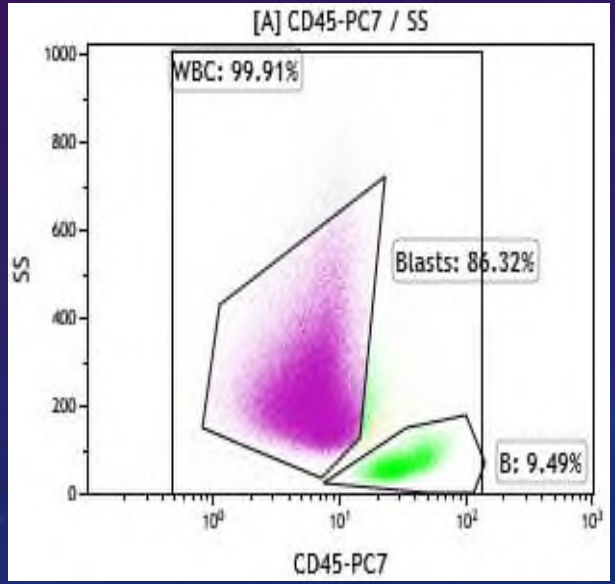


Μονοβλάστες : CD64+ CD36+ CD11b+ CD4+ **CD14 - IREM2 - MPO -**
 Προμονοκύτταρα : CD64++ CD36+ CD11b+ CD4+ **CD14 + IREM2 - MPO dim**
 Μονοκύτταρα : CD64++ CD36+ CD11b+ CD4+ **CD14 + IREM2 + MPO dim**

Ανάλυση οξείας Λευχαιμίας



MPO+++ CD33+++ **HLADR- CD34- CD15- CD11b- M3**



• Σπάνιες λευχαιμίες

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

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

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

ΣΥΝΕΚΤΙΜΗΣΗ για διάγνωση και θεραπεία

ΕΚΦΡΑΣΗΣ , ΣΥΝΕΚΦΡΑΣΗΣ ή ΑΠΟΥΣΙΑΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΔΕΙΚΤΩΝ στο σύνολο αλλά και ειδικών για διαφοροδιάγνωση

ΠΟΣΟΣΤΩΝ, ΑΠΟΛΥΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ (πχ Β ΚΥΤΤΑΡΩΝ, ΧΛΛ ή ΜΒΛ, CD4 για αντιρετροϊκή θεραπεία, CD34+ στη μεταμόσχευση μυελού), ΕΝΤΑΣΗΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (συσχετίζεται με το νόσημα και το βαθμό κυτταρικής ωρίμανσης)

Αποτελεσμάτων από βιοψία, μοριακές και κυτταρογενετικές εξετάσεις όπου απαιτούνται

Μελέτες συσχέτισης ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών με γενετικές διαταραχές
HLA-DR- CD34- (CD56+CD123+CD133-), + Μορφολογία + αρνητικός καρυότυπος **FLT3-ITD+**
CD34- CD117+ CD13+CD15+CD33++ CD123+ HLA-DR+/- **NPM1+**

Έκθεση αποτελέσματος σε μια ΟΛ

Όνοματεπώνυμο, 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

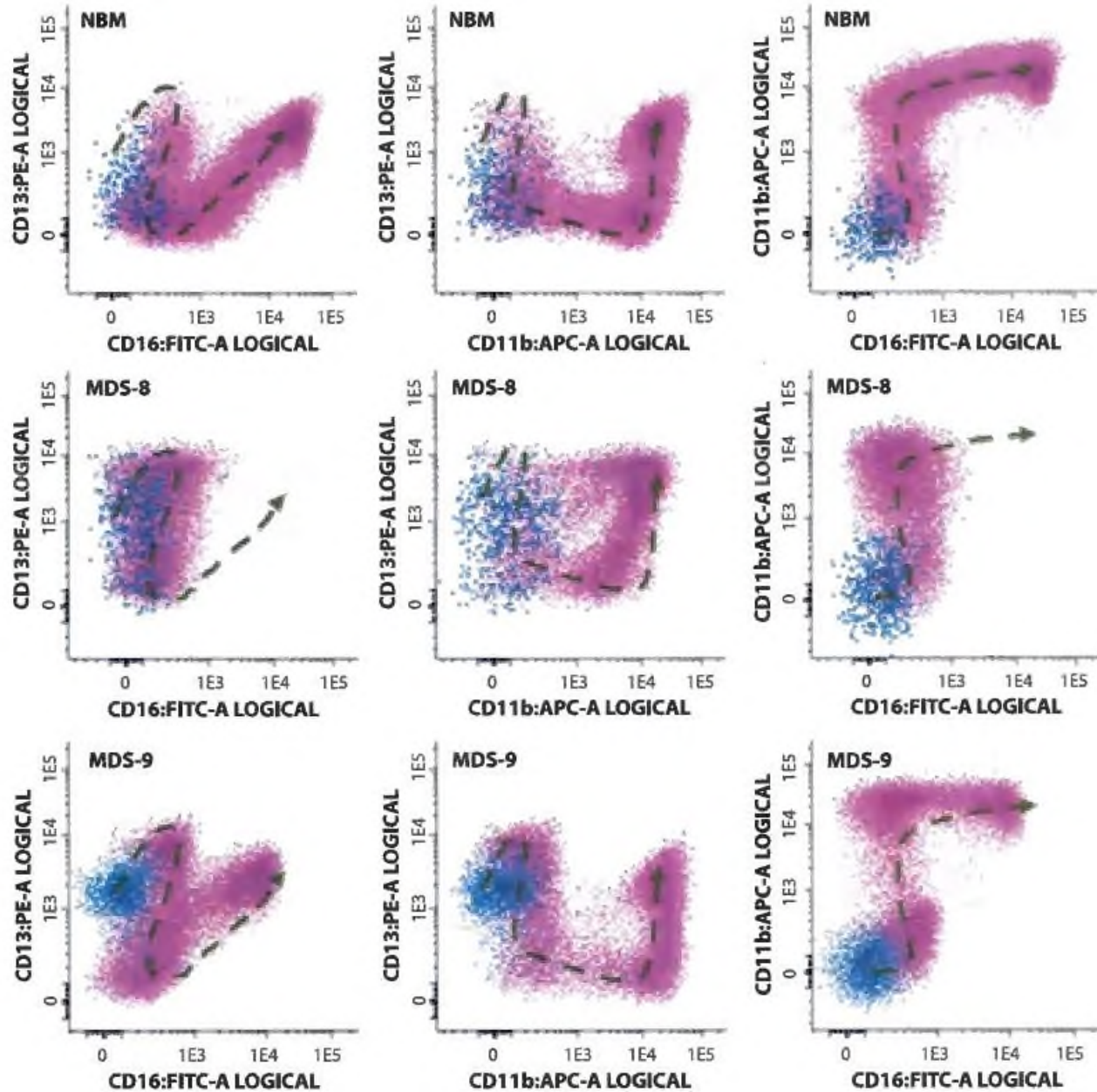
- Ποσοστό % των βλαστών στο σύνολο των εμπυρήνων κυττάρων του δείγματος
- Αναφορά των δεικτών που εκφράζει ο παθολογικός πληθυσμός
- ✓ Αναφέρονται πρώτα οι δείκτες που χαρακτηρίζουν την σειρά και το στάδιο διαφοροποίησης και ωρίμανσης του βλαστικού πληθυσμού, οι δείκτες αωρότητας (αν εκφράζονται) και τέλος τυχόν 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.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Ε) ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΙΕΣ

ΜΔΣ, patterns



ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΜΥΕΛΟΣ

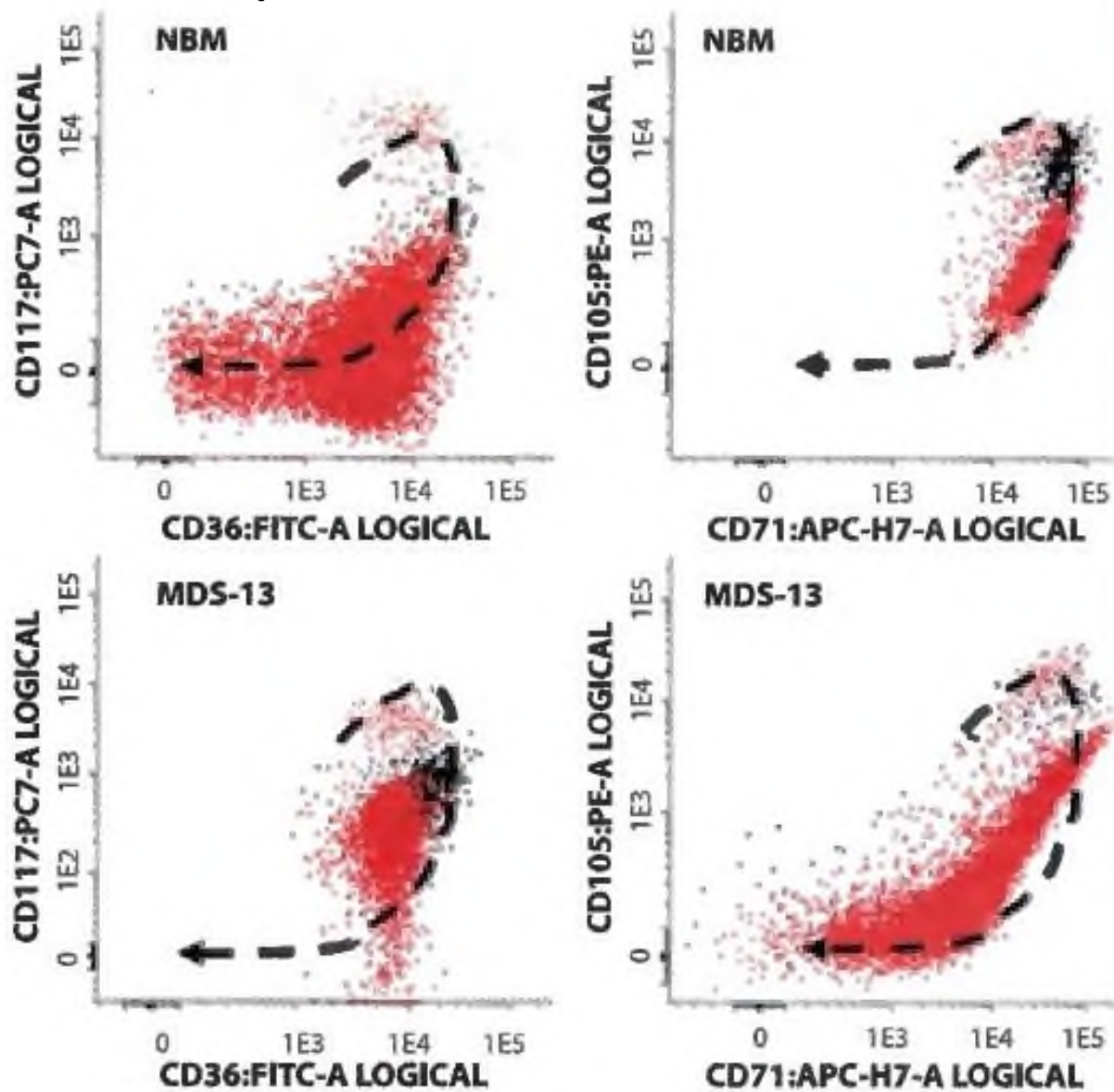
ΜΔΣ 1

ΜΔΣ 2

Multiparameter Flow Cytometry in the Diagnosis of Hematologic Malignancies, A Porwit MC Bene

ΜΔΣ, patterns

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΜΥΕΛΟΣ



Ogata Score

1. SSC linear of neutrophils (defined as ratio to lymphocyte SSC for internal reference);
2. % CD34+ MyPCs among all nucleated cells;
3. % CD34+ B-cell precursors among all CD34+ cells;
4. CD45 expression of MyPCs (as ratio to lymphocytes' CD45 expression).

Αποκλίσεις από ΦΤ αναφοράς
βαθμολογούνται με 1 με μέγιστο το 4
Βαθμολογία (score) ≥ 2 ενδεικτικό για ΜΔΣ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

ΣΤ) ΕΛΑΧΙΣΤΗ (Μετρήσιμη) ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΜΕΝΗ ΝΟΣΟΣ
(ΕΥΝ)

Ελάχιστη Υπολειπόμενη Νόσος (ΕΥΝ)

B-ΟΛΛ

T-ΟΛΛ

στόχος : απομόνωση με δεδομένη στρατηγική, ενός αθροίσματος (cluster) μετρικών γεγονότων (events), τα οποία να ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα αθροίσματα (φυσιολογικών κυττάρων) και να αφορούν τα υπολειμματικά νεοπλασματικά κύτταρα. Δηλ έγκαιρη ανίχνευση λευχαιμικού κυττάρου με δυναμική ανάκαμψης.

B –ΧΛΛ

Τριχωτή Λ

Ποσοτικός προσδιορισμός σε επίπεδο Λογαρίθμων
Νόσος 1% - επίπεδο 10^{-2} Νόσος 0,1% - επίπεδο 10^{-3}

ΟΜΛ

Βσικοί Περιορισμοί

Δεν υπάρχουν μονοκλωνικά αντισώματα απόλυτα ειδικά για τα λευχαιμικά κύτταρα
Λευχαιμικά κύτταρα: γενετικά και ανοσοφαινοτυπικά ασταθή
Σπάνια «φυσιολογικά» κύτταρα ή άτυπα κύτταρα «αδιευκρίνιστης σημασίας»
Τεχνικές δυσκολίες, αντιστάθμιση φθορισμών (compensation), μη ειδικός φθορισμός (artifacts)

B μη Hodgkin
Λεμφώματα

Πολλαπλούν
Μυέλωμα

Στρατηγική (συχνά εξειδικευμένη)

«κενών Τόπων» (empty spaces) ή των «λευχαιμικών ανοσοφαινοτυπικών συνδυασμών» (Leukemia Associated Phenotypes, LAP ή LAIP).

Μεταμόσχευση
Μυελού

Ελάχιστη Υπολειπόμενη Νόσος (ΕΥΝ)

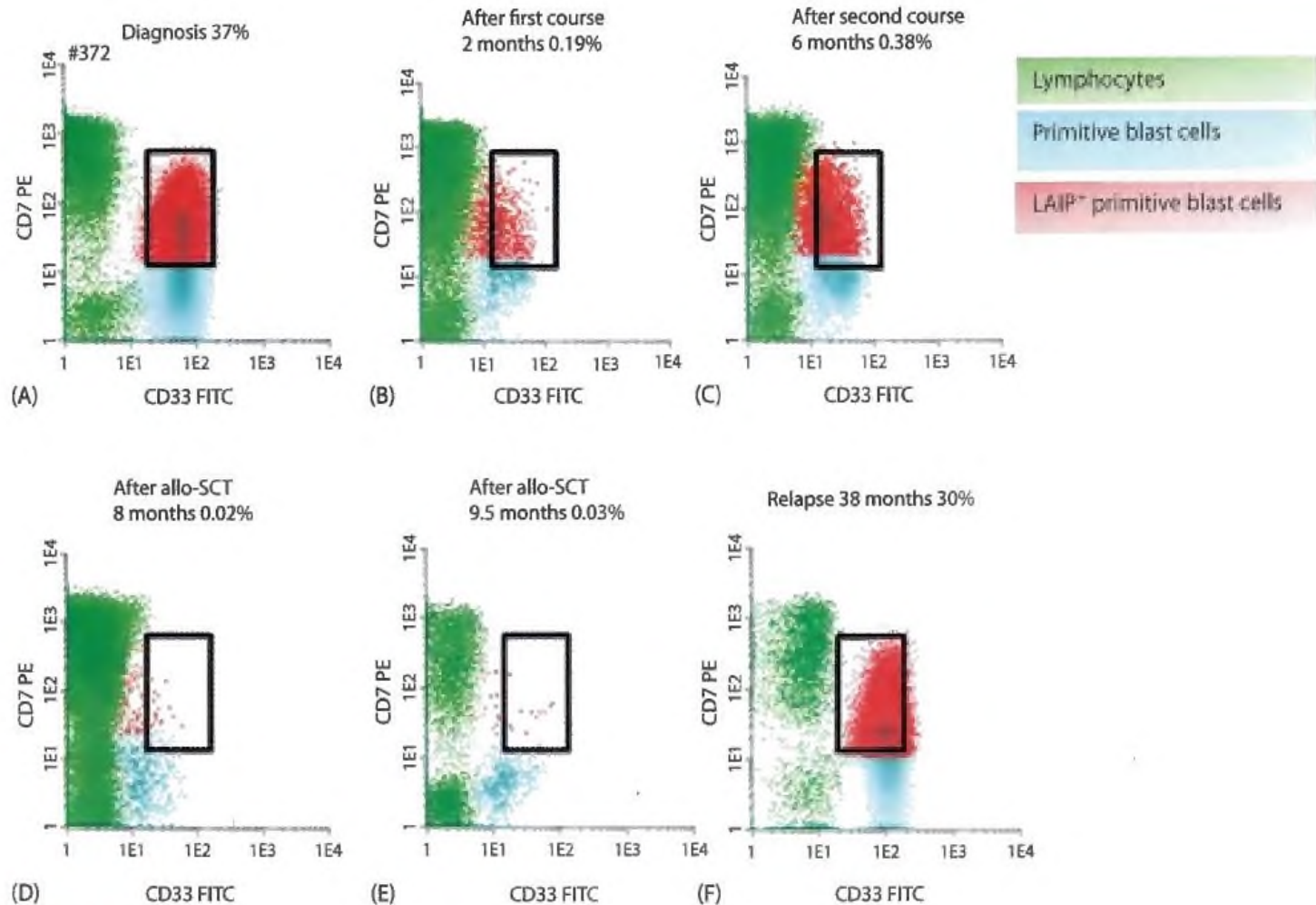


Figure 11.5 Changes in intensity of marker expression from diagnosis to relapse.

The Figure shows a CD34⁺CD7⁺CD33⁺ leukaemia-associated immunophenotype (LAIP) at diagnosis (A). The intensity of CD33 expression within the aberrant immunophenotype decreases during treatment/disease (B–E) and recovers to diagnosis intensity at relapse (F). Applying the diagnosis gating settings for follow-up situations would result in underestimation of LAIP percentages.

Multiparameter Flow Cytometry
in the Diagnosis of Hematologic
Malignancies, A Porwit MC Bene

Ελάχιστη Υπολειπόμενη Νόσος (ΕΥΝ)

ΟΜΛ : **LAIP** **συνέκφραση** δύο αντιγόνων διαφόρων σειρών π.χ. μυελικής και Β λεμφικής (Tdt+CD33+)

ασύγχρονη έκφραση, δηλαδή άωρα με ώριμα π.χ. CD34+CD14+

(Infidelity)

απουσία έκφρασης σε σχέση με την αναμενόμενη π.χ CD34+DR- αντί DR+,

ή **υπερέκφραση** όσον αφορά την ένταση CD34+CD123bright αντί για CD123dim.

Οι στρατηγικές ανίχνευσης ΕΥΝ με ΚΡ είναι ένα δυναμικό πεδίο, το οποίο συνεχώς μεταβάλλεται και τροποποιείται ανάλογα με την εμπειρία και την εξέλιξη της τεχνολογίας (αναλυτές και αντισώματα).

Ανάγκη για εξειδικευμένα εργαστήρια - κέντρα αναφοράς

Ελάχιστη Υπολειπόμενη Νόσος (ΕΥΝ)

Chapter 11: Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukaemia

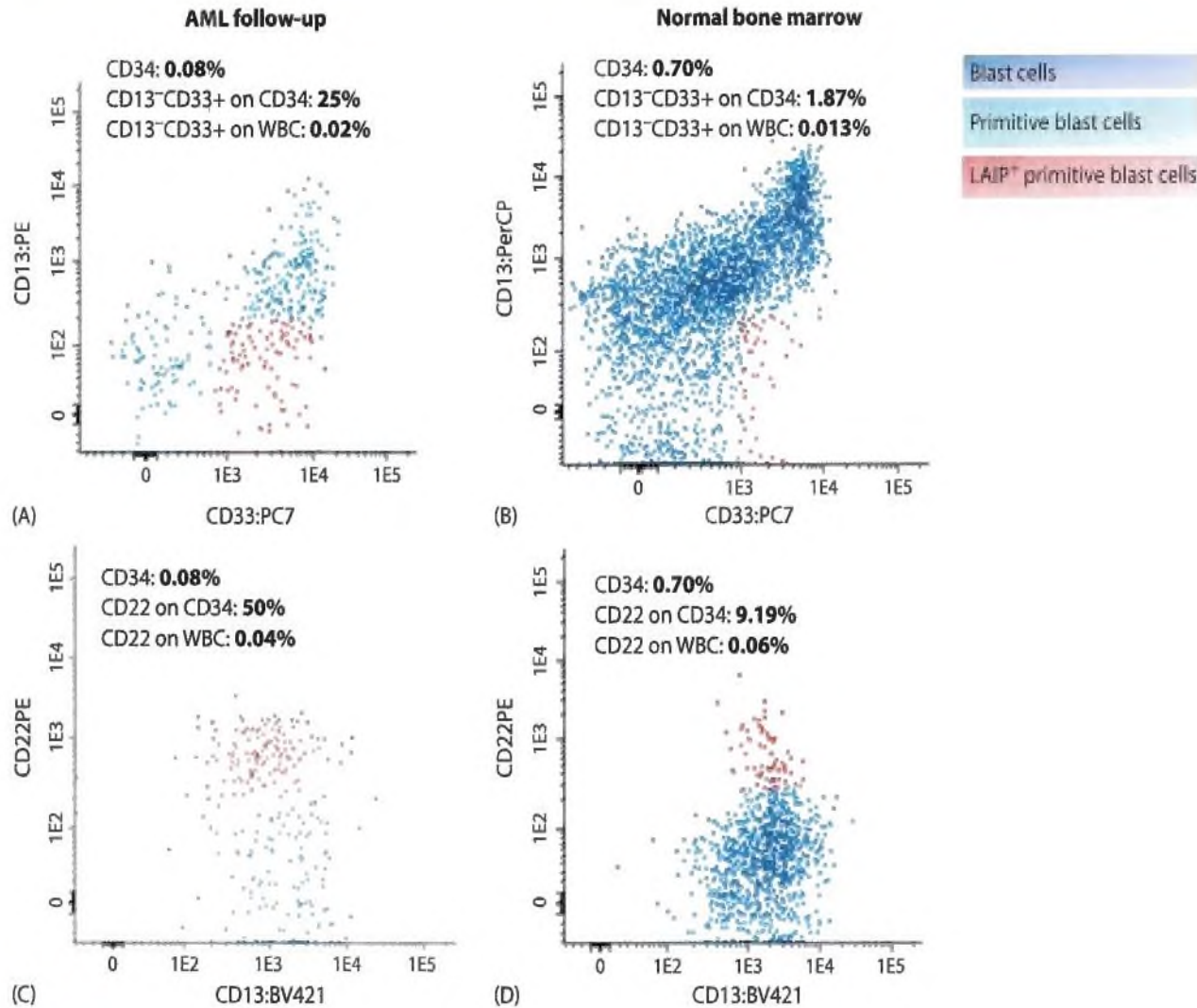


Figure 11.4 High specificity of markers allows to define low minimal residual disease (MRD) percentages.

Table 11.1 Role of normal CD34% and LAIP hereon in defining true MRD

Normal BM of Fig 3B	Normal BM with CD34% normalised to the AML BM in Fig. 3A (0.08%)
CD34: 0.70% CD13 ⁻ CD33 ⁺ on CD34: 1.87% CD13 ⁻ CD33 ⁺ on WBC: 0.013% MRD factor 1.54x higher than NBM	CD34: 0.08% CD13 ⁻ CD33 ⁺ on CD34: 1.87% CD13 ⁻ CD33 ⁺ on WBC: 0.0015% MRD factor 13.3x higher than NBM
Conclusion for A: no clear MRD	Conclusion for A: clear MRD
Normal BM of Fig 3D	Normal BM with CD34% normalised to the AML BM in Fig. 3C (0.08%)
CD34: 0.70% CD22 on CD34: 9.19% CD22 on WBC: 0.06% MRD factor 1.5 lower than NBM	CD34: 0.08% CD22 on CD34: 9.19% CD22 on WBC: 0.0069% MRD factor 5.8 higher than NBM
Conclusion for C: no clear MRD	Conclusion for C: clear MRD

Multiparameter Flow Cytometry in the Diagnosis of Hematologic Malignancies, A Porwit MC Bene

ΛΗΨΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

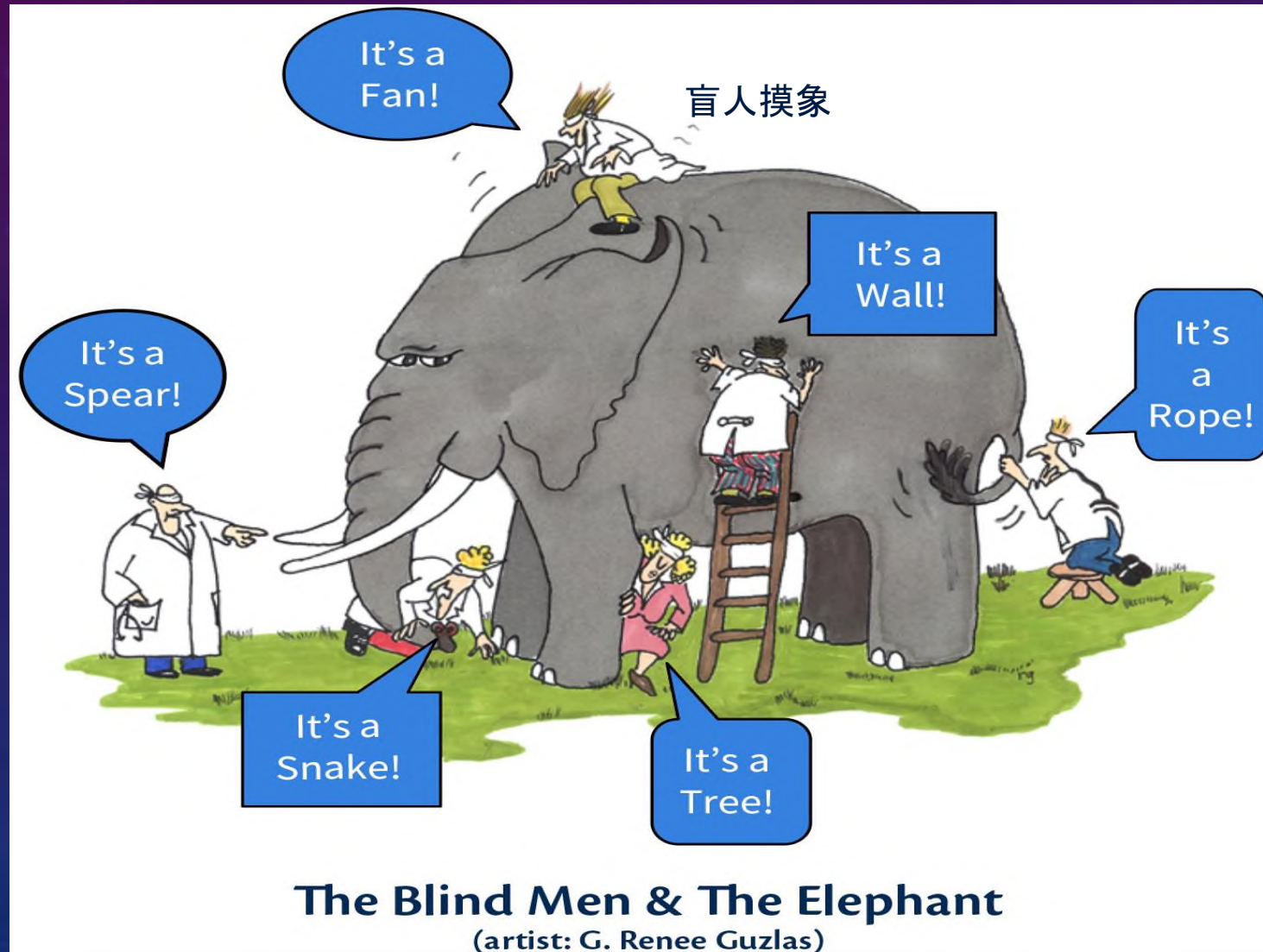
ΛΗΨΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

- Κάθε μέτρηση Σκέδασης ή Φθορισμού συλλέγεται στον αντίστοιχο ανιχνευτή
- Ο αριθμός των παραμέτρων (ή μεταβλητών) διαφέρει ανάλογα με την εφαρμογή αλλά και τον εξοπλισμό πχ σε σωληνάριο που έχουν προστεθεί αντισώματα 5 διαφορετικών χρωστικών είναι 7 παραμέτρων (FS, SS, και 5 φθορισμών)
- Τα δεδομένα συλλέγονται σε «λίστα» με τις τιμές από κάθε παράμετρο και για κάθε «μετρικό γεγονός» (κύτταρο)
- Τα παραγόμενα αρχεία ονομάζονται **“ListMode Files” (LMD)** τα οποία σώζονται με συγκεκριμένο τρόπο (format), FCS 3.0 (τρέχων). Απαραίτητο κατά την ανάλυση με χρήση λογισμικού διαφορετικού από της λήψης δεδομένων.
- Με τα προγράμματα ανάλυσης μπορούμε να τροποποιήσουμε την αρχική οριοθέτηση και να αποκλείσουμε γεγονότα. **Πλεονέκτηματα** : δεν απαιτείται επανάληψη δείγματος, παρέχεται χρόνος για την ανάλυση δύσκολων εφαρμογών όπως η υπολλειπόμενη νόσος (MRD), ελευθερώνεται ο αναλυτής για χρήση.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΟΛΛΩΝ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ

The Blind Men and The Elephant

High-dimensional distribution



ΛΗΨΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ, ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

- Όσες περισσότερες παραμέτρους διαθέτουμε, τόσο πιο περίπλοκη η ανάλυση
- Περισσότερες παράμετροι σημαίνουν περισσότερες πιθανότητες προσδιορισμού του υπό μελέτη πληθυσμού
- Τα στικτογράμματα βοηθούν αλλά ίσως δεν επαρκούν
- Ανάγκη για φιλικό και γρήγορο λογισμικό πέραν αυτού της λήψης δεδομένων (Kaluza, Flow Jo, Infinicyt κλπ)

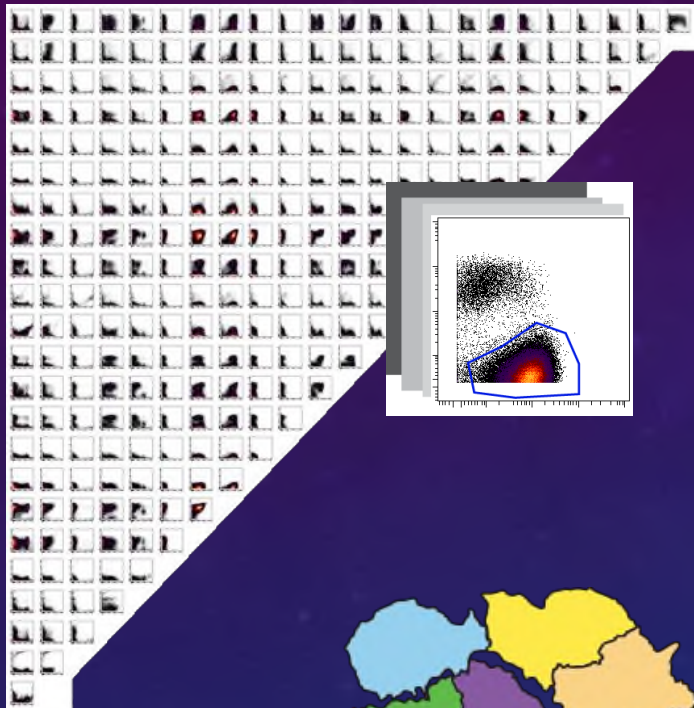
• Στο μέλλον



- Principle Component Analysis, viSNE, SPADE, CITRUS, FLOWSOM χρήσιμα στην πολυπαραμετρική ανάλυση

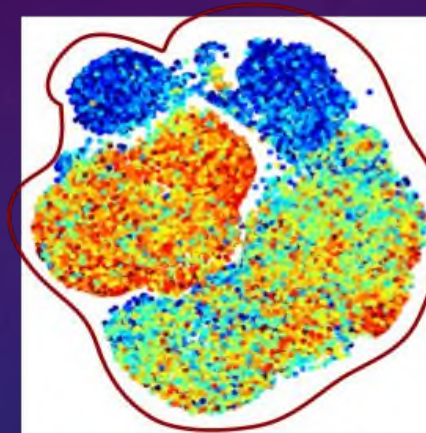
ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ «MACHINE LEARNING» ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ

Raw Data Processing,
Quality Control

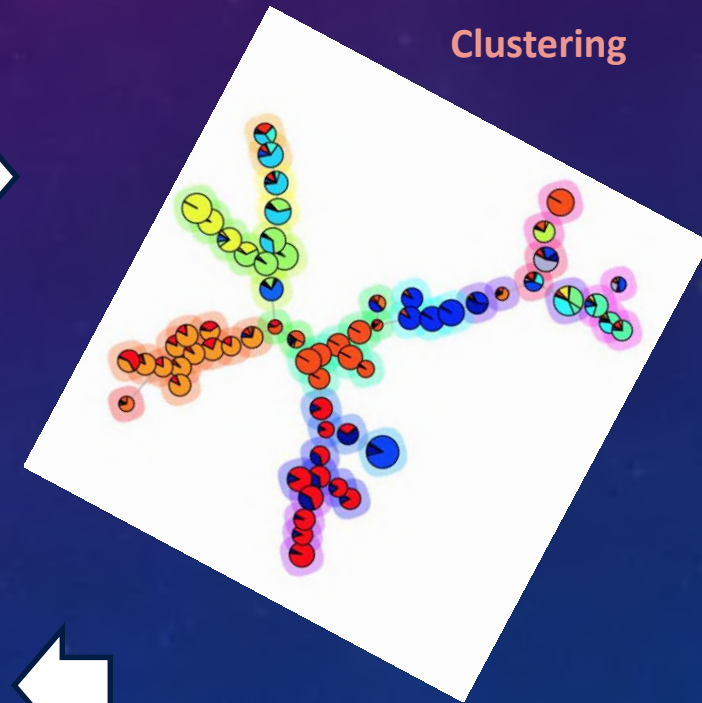


Data Visualization

Dimensionality
Reduction

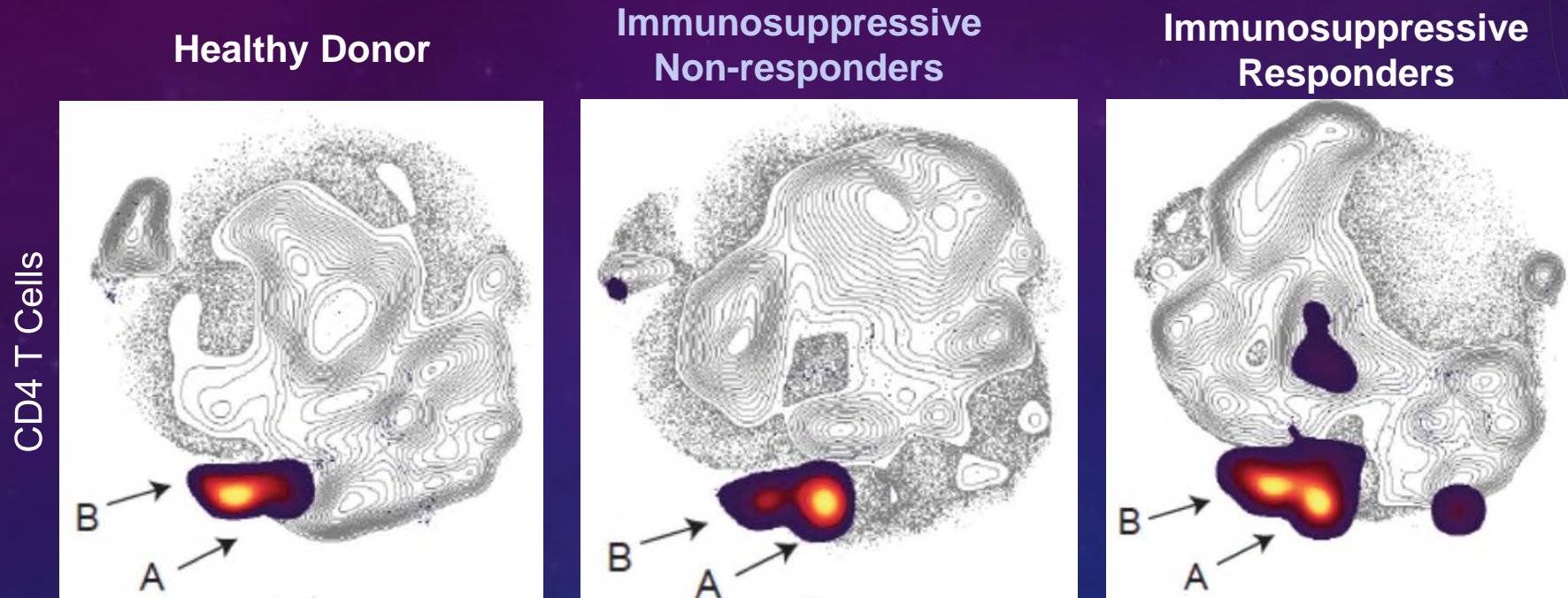


Clustering



	CD3	CD4	CD8a	CD69	CD45RA
Naïve CD4 ⁺ T cells	Yellow	Yellow	Black	Black	Yellow
Memory CD4 ⁺ T cells	Yellow	Yellow	Black	Black	Black
Naïve CD8 ⁺ T cells	Yellow	Black	Yellow	Yellow	Yellow
Memory CD8 ⁺ T cells	Yellow	Black	Black	Black	Black

MACHINE LEARNING ALGORITHMS



Highlighted Treg: $CD25^{+}Foxp3^{+}CD127^{-}$

- viSNE density plots revealed two Treg subpopulations
- Non-responders have more A subpopulation than non responders/healthy
- B subpopulation has more memory/activation phenotype

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Διαδραστική τεχνική, συνεχώς εξελισσόμενη
- Μεγάλος αριθμός σωματιδίων - >25.000 eps (events per second) – Ταχύτητα
- Ταυτόχρονος προσδιορισμός διαφορετικών πληθυσμών χωρίς να απαιτείται διαχωρισμός
- Ανάλογα με την ασθένεια υποστηρίζει σε διαφορετικό βαθμό διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία
- Προϋπόθεση για εξειδικευμένο Κυτταροδιαχωρισμό
- Πολυπαραμετρική, (πολυδιάστατη) το σύνολο της πληροφορίας βασίζεται στο συνδυασμό πολλών διαστάσεων



DRAWING THE BOW.

Drawing the Bow for Reproducibility, Attila Tárnok

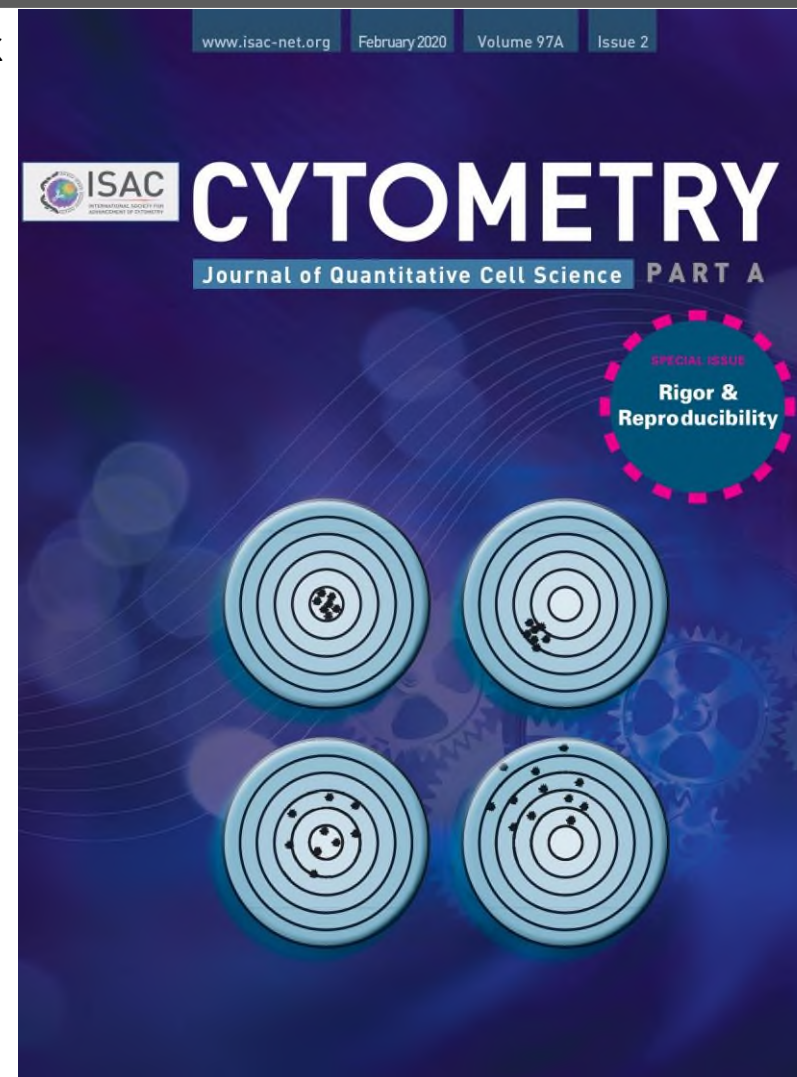
Improving the Rigor and Reproducibility of Flow Cytometry-Based Clinical Research and Trials Through Automated Data Analysis Ryan R. Brinkman

Rigor and Reproducibility of Cytometry Practices for Immuno-Oncology: A Multifaceted Challenge Tamara J. Laskowski, Amy L. Hazen, Renata S. Collazo, David Haviland

Relevance of Antibody Validation for Flow Cytometry Tomas Kalina, Kelly Lundsten, Pablo Engel

Reproducibility of Flow Cytometry Through Standardization: Opportunities and Challenges

Figure 1. The bowman by Maurice Thompson - The witchery of archery: a complete manual of archery (1878). From Wikipedia (<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8687330>). (This work is in the public domain in its country of origin and other countries and areas where the copyright term is the author's life plus 100 years or less.)



ΠΗΓΕΣ

Flow cytometry strikes gold J. Paul Robinson and Mario Roederer, Science, 13 NOVEMBER 2015, VOL 350 ISSUE 6262 739

Paul Robinson, Purdue University BMS 631 - 632

Multiparameter Flow Cytometry in the Diagnosis of Hematologic Malignancies, A Porwit MC Bene

M Keeney et al ,A QA Program for MRD Testing Demonstrates That Systematic Education Can Reduce Discordance Among Experienced Interpreters. Cytometry Part B (94B:239–249 (2018)

M Reiter et al, Automated Flow Cytometric MRD Assessment in Childhood Acute B- Lymphoblastic Leukemia Using Supervised Machine Learning, Cytometry (Part A), 2019

Βασική εκπαίδευση στην Κυτταρομετρία Ροής. Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία – Οξείες Λευχαιμίες Αδιευκρίνιστης Σειράς – Μαθήματα Κυτταρομετρίας Ροής, Ιωάννινα 2013, Λίλα Δημητρακοπούλου

Μελέτη και Ανάλυση του Ανοσοφαινότυπου στη Διάγνωση και Παρακολούθηση των Οξείων Λευχαιμιών, Μαριάννα Τζανουδάκη

Υπολειμματική νόσος σε κακοήθη νοσήματα του αιμοποιητικού ιστού, Γ. Πατεράκης

Vitreous and aqueous fluid flow cytometry in the diagnosis of ocular lymphoma, fourteen years of experience G. Paterakis, T. Papadaki, Markomichelakis N, P. Vasileiou ESCCA 2017

Ευχαριστίες

Χρυσάνθη Βαδικόλια, Αιματολογική Κλινική 424

Ευάγγελος Γιαμαρέλλος, Δ' Παθολογική Κλινική, Αττικό

Λίλα Δημητρακοπούλου, Ανοσολογικό Εργαστήριο, Λαϊκό

Γ. Πατεράκης, Ανοσολογικό Εργαστήριο Γ. Γεννηματάς

Μαριάννα Τζανουδάκη, Ανοσολογικό Εργαστήριο Αγ Σοφία

Κατερίνα Ψαρρά, Ανοσολογικό Εργαστήριο Ευαγγελισμός