

**ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ  
ΚΑΙ  
ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ**

ΜΑΡΙΑ ΓΕΩΡΓΙΟΥ, PhD  
LERIVA DIAGNOSTICS

**1947** Gucker, προσδιορισμός βακτηρίων και σπόρων σε αερολύματα

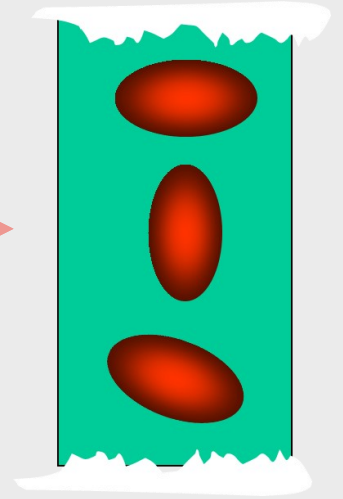
**1964** Mack Fulwyler & Clarence Lushbaugh : 2 είδη ερυθροκυττάρων? →

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

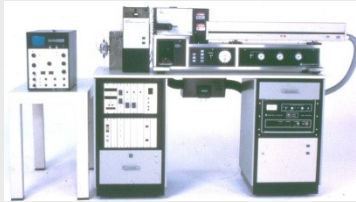
**1969** Leonard Herzenberg, Wolfgang Gohde, Cezar Milstein, George Kohler : Monoclonal Abs + FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)

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

**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.



# ΕΞΕΛΙΞΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ (BECKMAN COULTER)



EPICS IV  
2 lasers, 3 colors



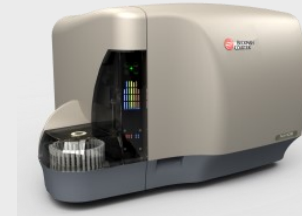
EPICS  
Profile II  
benchtop  
Cytometer



EPICS XL™  
Fully automated clinical  
cytometer



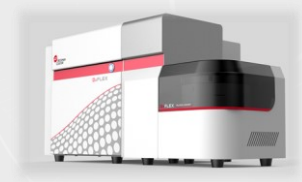
FC500 advanced  
cytometer



Navios



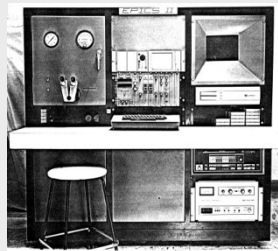
Aquios



DxFLEX

1970

EPICS II  
First Laser  
Analyzer



1980

EPICS 750 – 3 laser  
sorter  
TPS



Q-PREP™  
introduced 1st  
automated flow  
prep



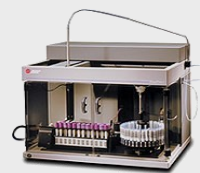
2000

EPICS ALTRA™  
Sorter



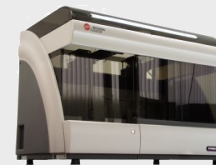
2005

PrepPlus™  
Sample preparation  
for flow cytometry



2009

FP1000 cytometry  
auto prep



2011

Astrios



2016

CytoFLEX  
Series



2021

CytoFLEX  
SRT



1970

1

1980

1 - 2

1990

3 - 8

2000

5 - 18

2010

>5

2020

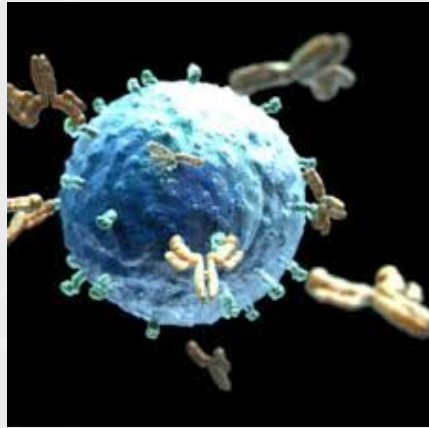
13 (CE)

ΔΕΙΚΤΕΣ/ΣΩΛΗΝΑΡΙΟ

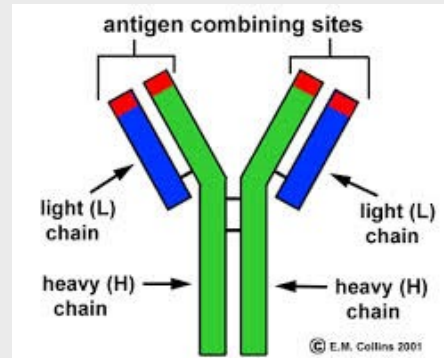
# ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

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

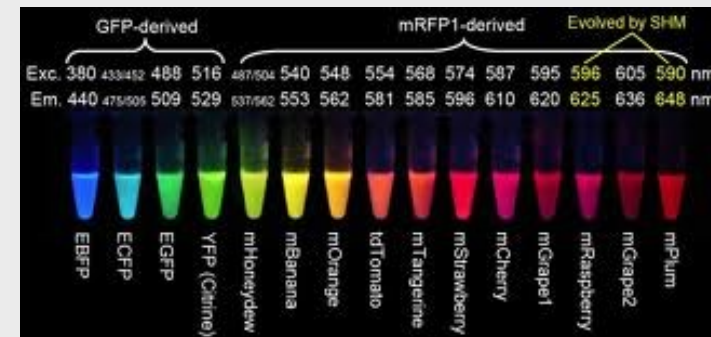
ΚΥΤΤΑΡΑ



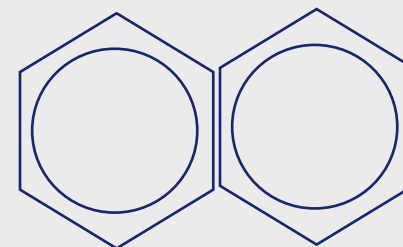
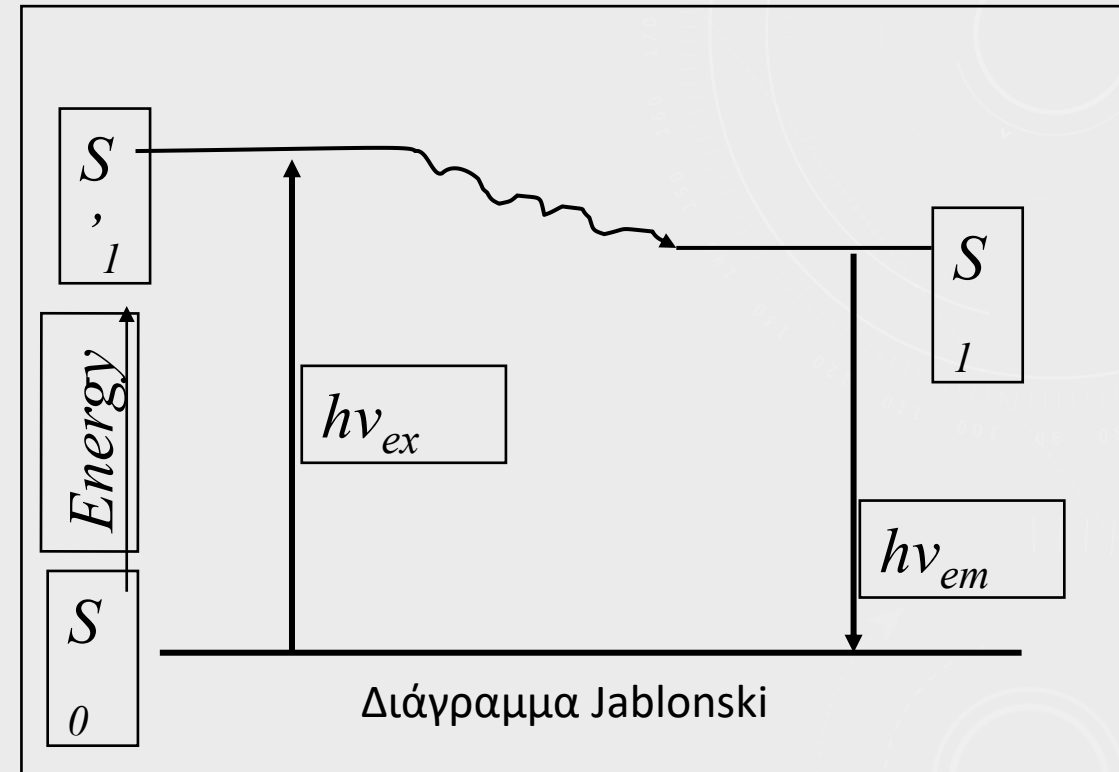
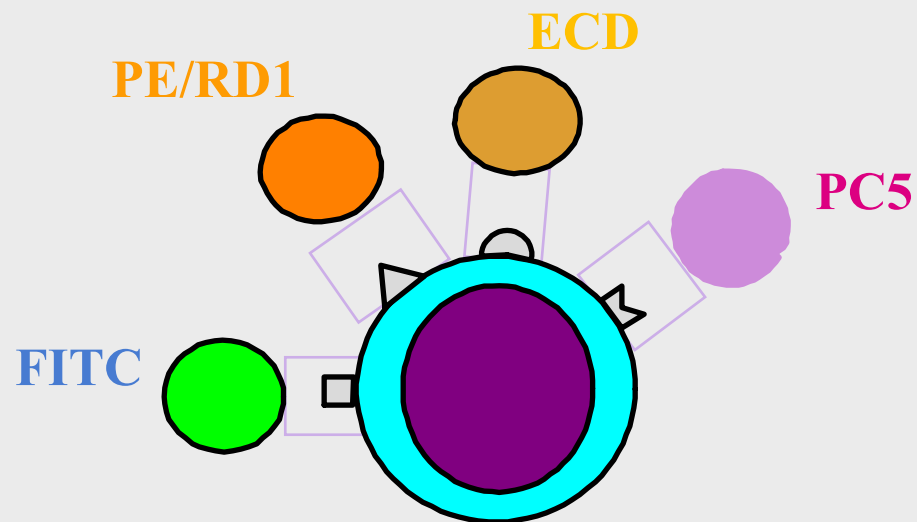
ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ  
ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ




ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ



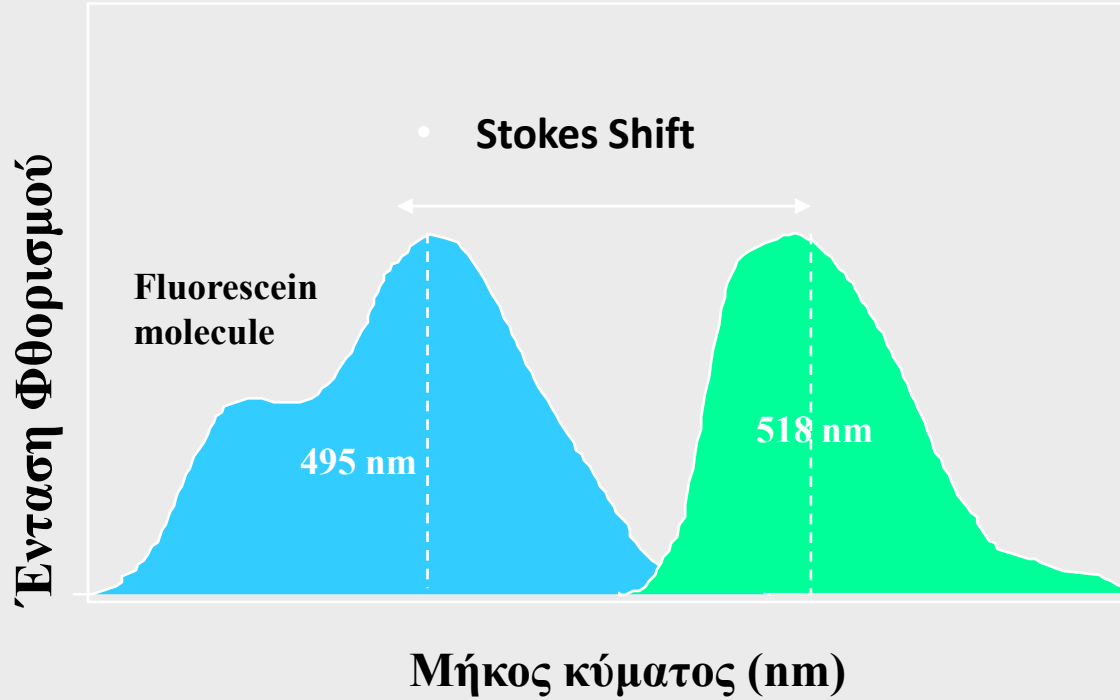
# ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ : ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ ΚΑΘΕ ΚΥΤΤΑΡΟΥ



## ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

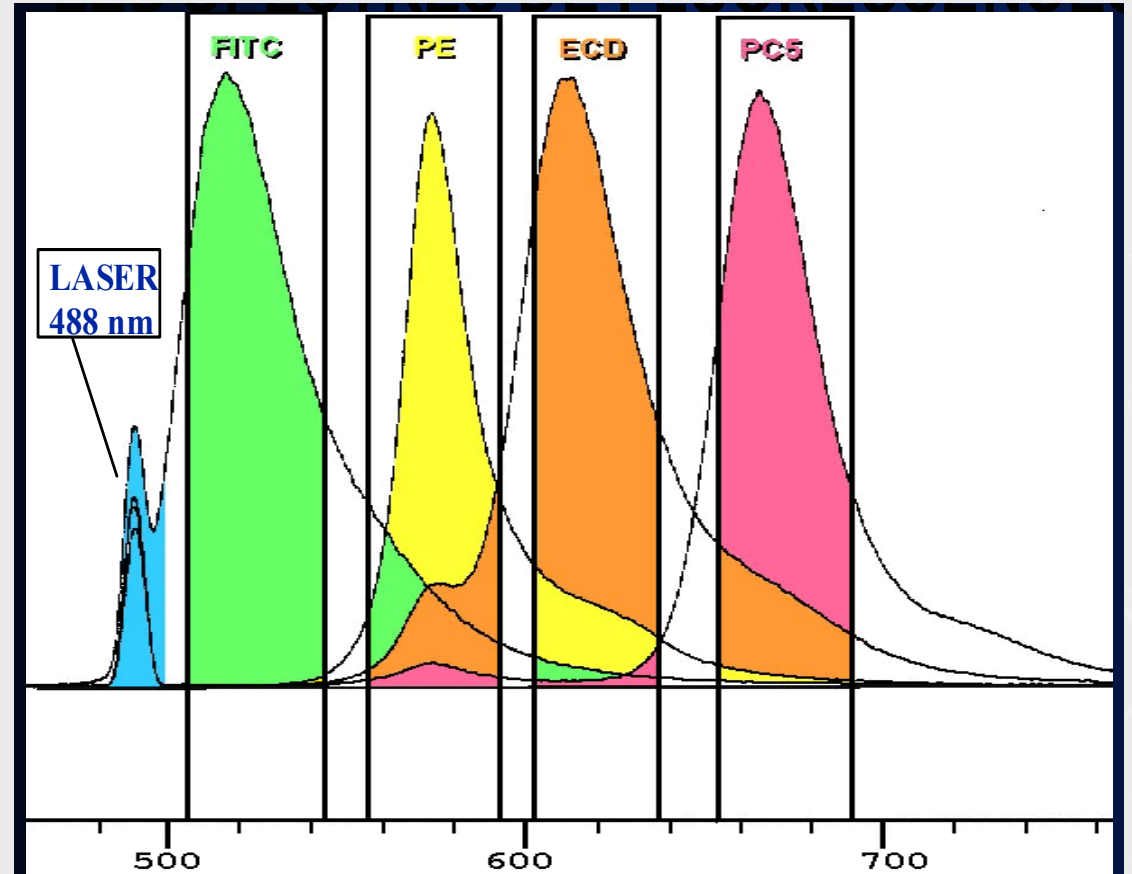
-  FITC
-  RD1/PE
-  ECD
-  PC5

# ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ



Αλληλεπικάλυψη φασμάτων εκπομπής

Ανάγκη για διόρθωση της αντιστάθμισης των φθορισμών (compensation)

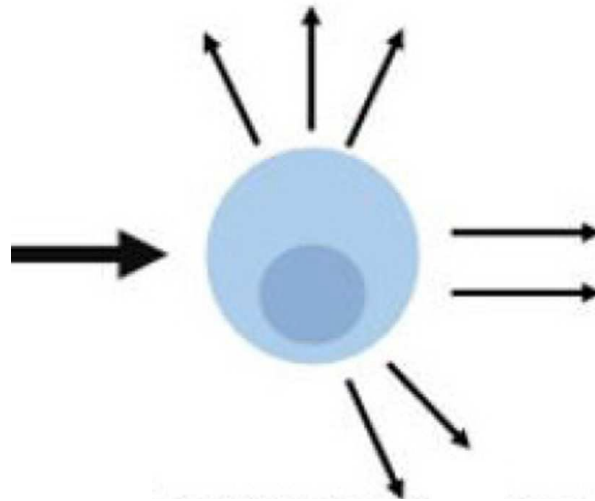


# Υδροδυναμική Εστίαση => μονήρη κύτταρα σε νηματική ροή

**A**

Sideward Scatter (SS) Πλάγιος  
Σκεδασμός  $90^{\circ}$  κοκκίωση,  
φθορισμός

Πηγή  
φωτός



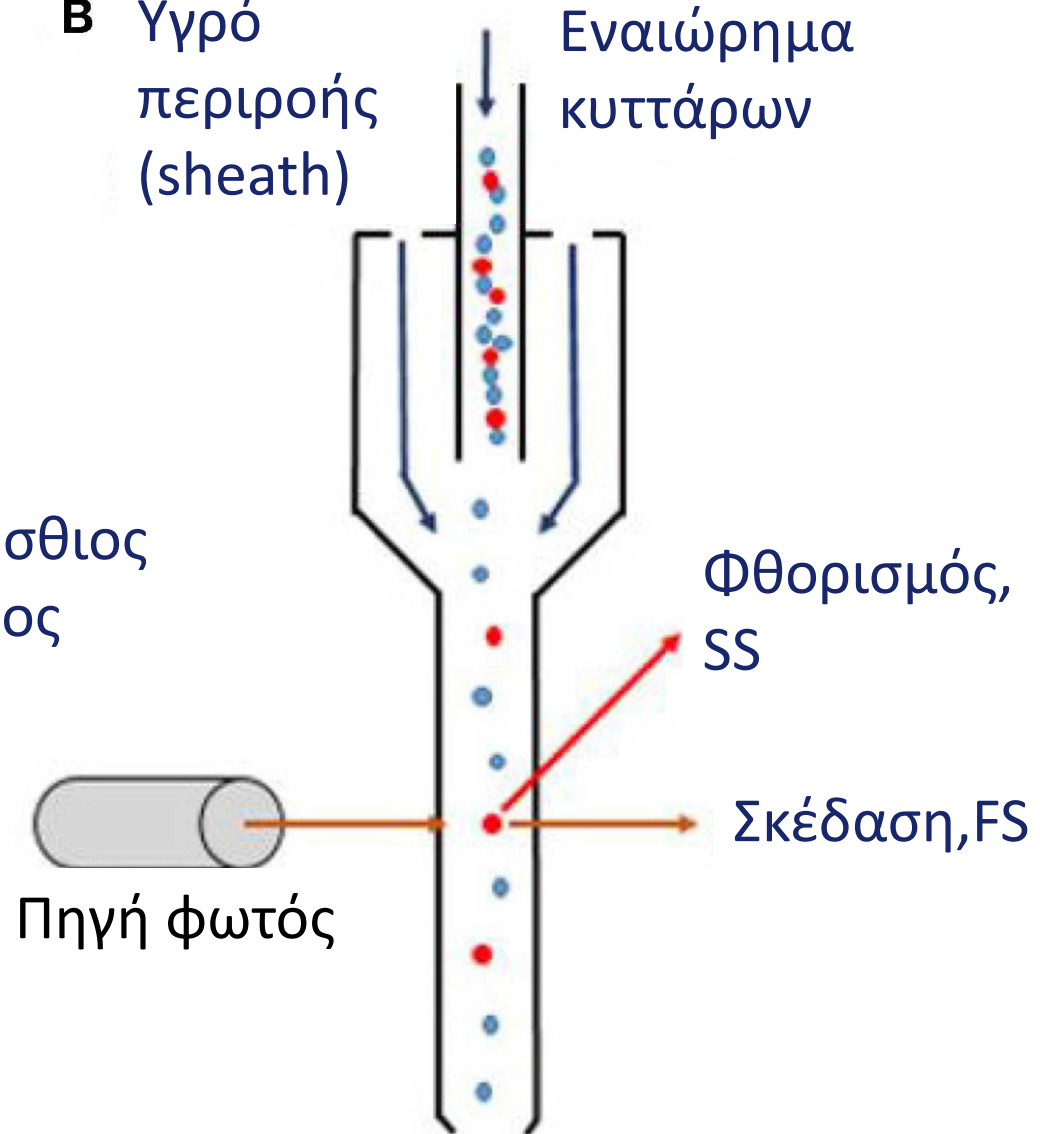
Forward Scatter (FS) Πρόσθιος  
Σκεδασμός  $1-19^{\circ}$  μέγεθος

Φθορισμός από αντιγόνα

**B**

Υγρό  
περιροής  
(sheath)

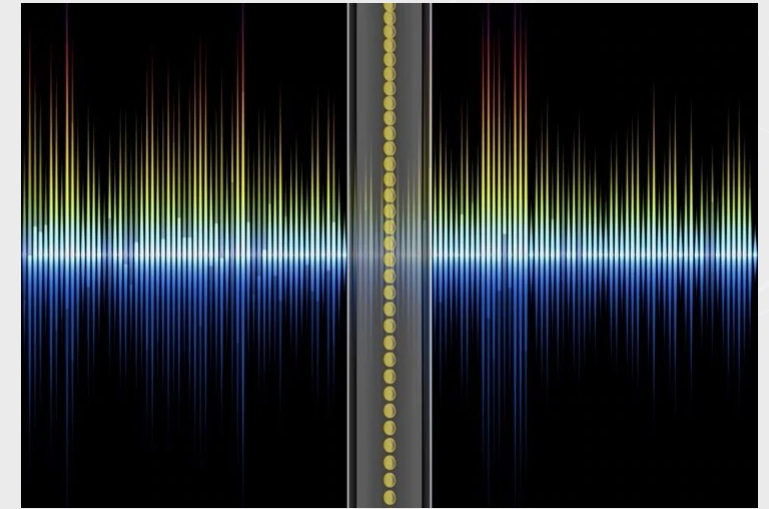
Εναιώρημα  
κυττάρων



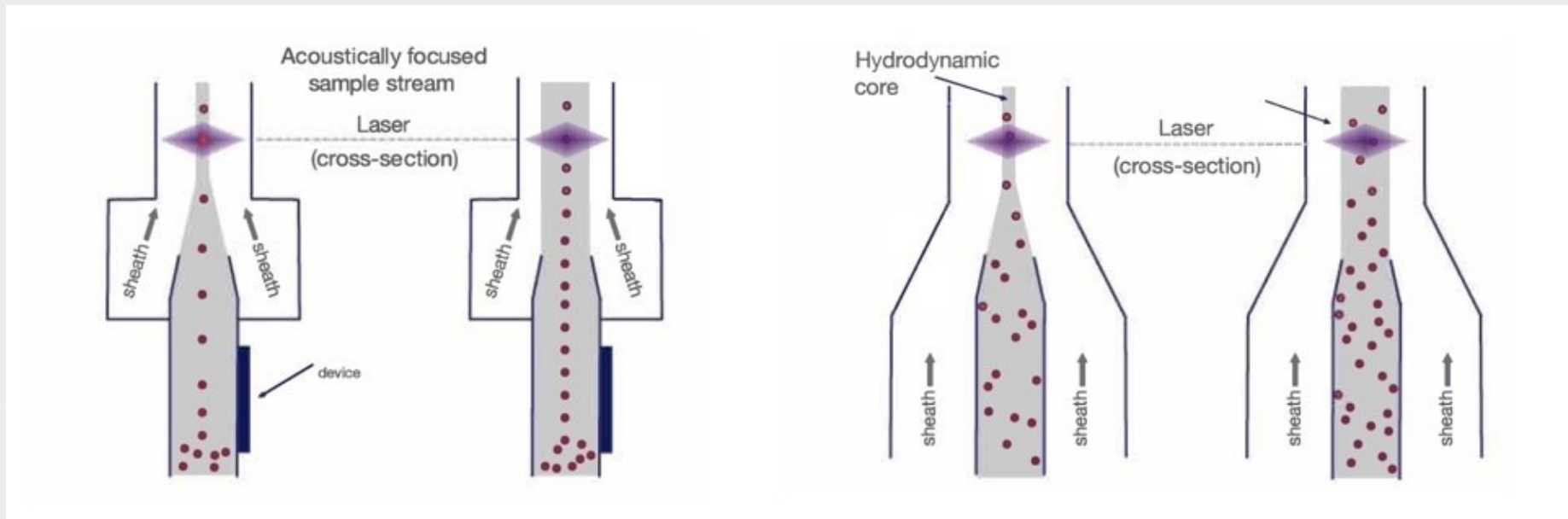


## Acoustic focusing

Combines ultrasonic waves like those used in medical imaging with hydrodynamic forces to precisely position cells into a single, focused line in the central axis. Enabling cells to be tightly focused at the point of laser interrogation allows the system to collect more photons, helping to ensure data quality regardless of the sample-to-sheath ratio.



ThermoFisher Scientific



- ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΕΣ ΡΟΗΣ

ΚΥΤΤΑΡΟΔΙΑΧΩΡΙΣΤΕΣ (FLOW SORTERS)

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΕΣ ΕΙΚΟΝΑΣ (IMAGING CYTOMETERS)

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΕΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟ ΜΑΖΗΣ (MASS CYTOMETERS)

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΕΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ (BEAD ARRAY)

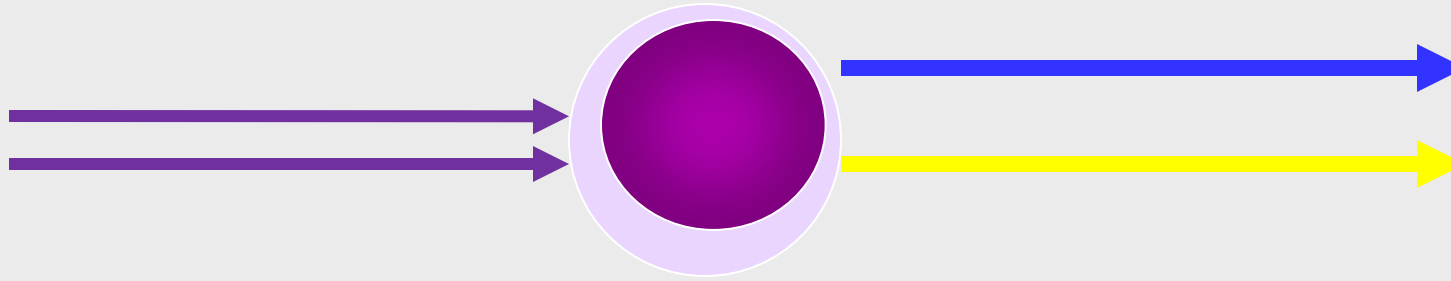
ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΕΣ ΑΚΟΥΣΤΙΚΗΣ ΕΣΤΙΑΣΗΣ (ACOUSTIC FOCUSING)

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΕΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (SPECTRAL ANALYZERS)

# Πολλαπλές πηγές LASER, ροή δείγματος



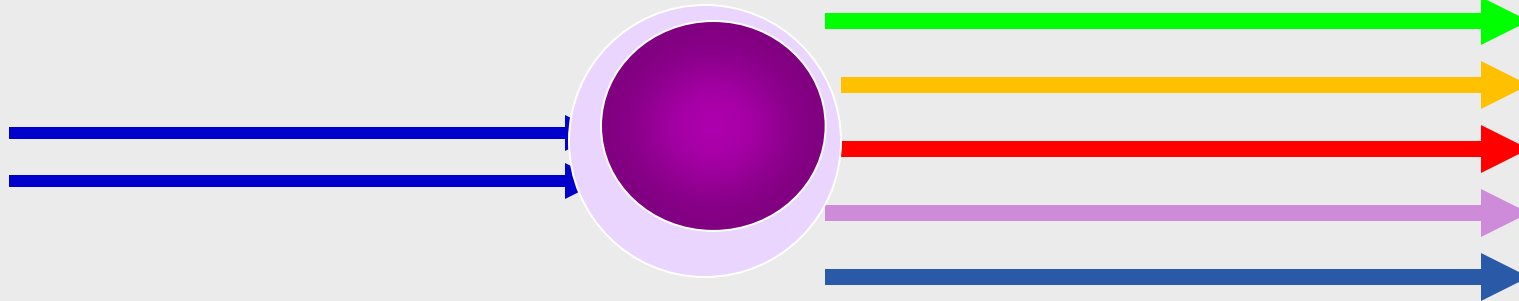
Violet  
laser  
405nm



**Pacific Blue**

**Krome Orange**

Blue laser  
488nm



**FITC**

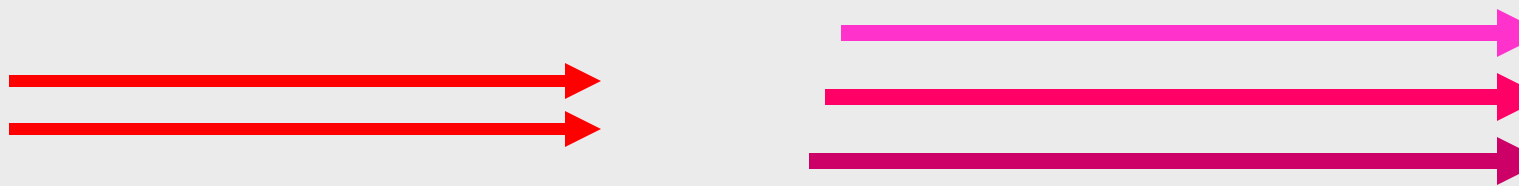
**PE**

**ECD**

**PE-Cy5.5**

**PE-Cy7**

Red laser  
638nm



**APC**

**APC- Alexafluor  
700**

**APC- Alexafluor  
750**

# ΚΥΤΤΑΡΟΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ

Συχνότητα σταγόνων ( Droplet frequency) : 30,000 Hz

- 35,000 Hz.

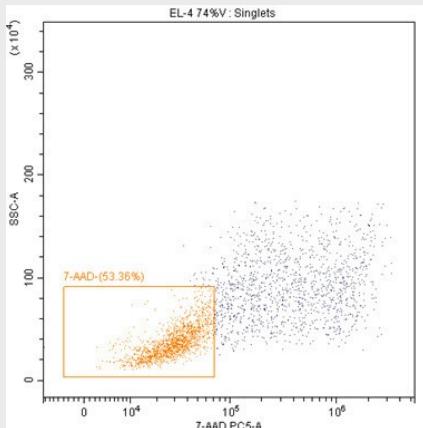
4-6 way sorting

Λήψη δεδομένων >40,000 eps (events/sec)

Ταχύτητα Διαχωρισμού (sorting speed) > 30,000 eps

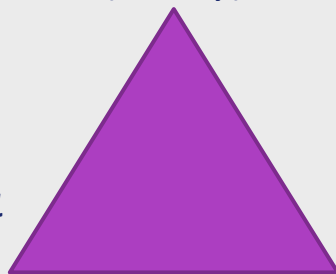
$30 \times 10^6$  events/ file

Ένα κύτταρο/σταγόνα



Καθαρότητα  
(Purity)

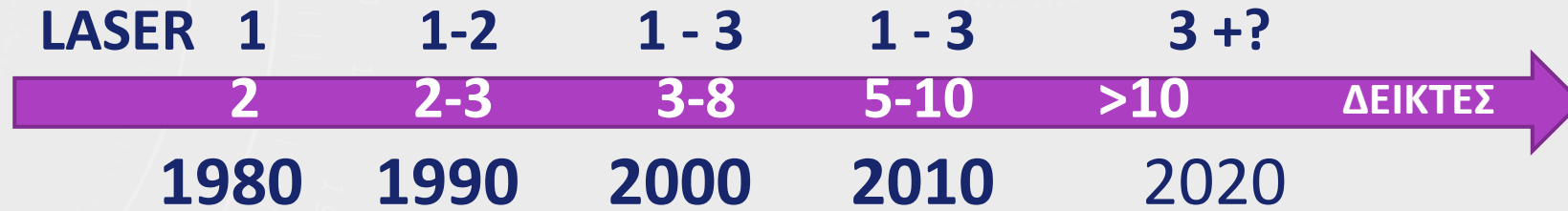
Βιωσιμότητα  
(Viability)



Ανάκτηση  
(Recovery)



# 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)**

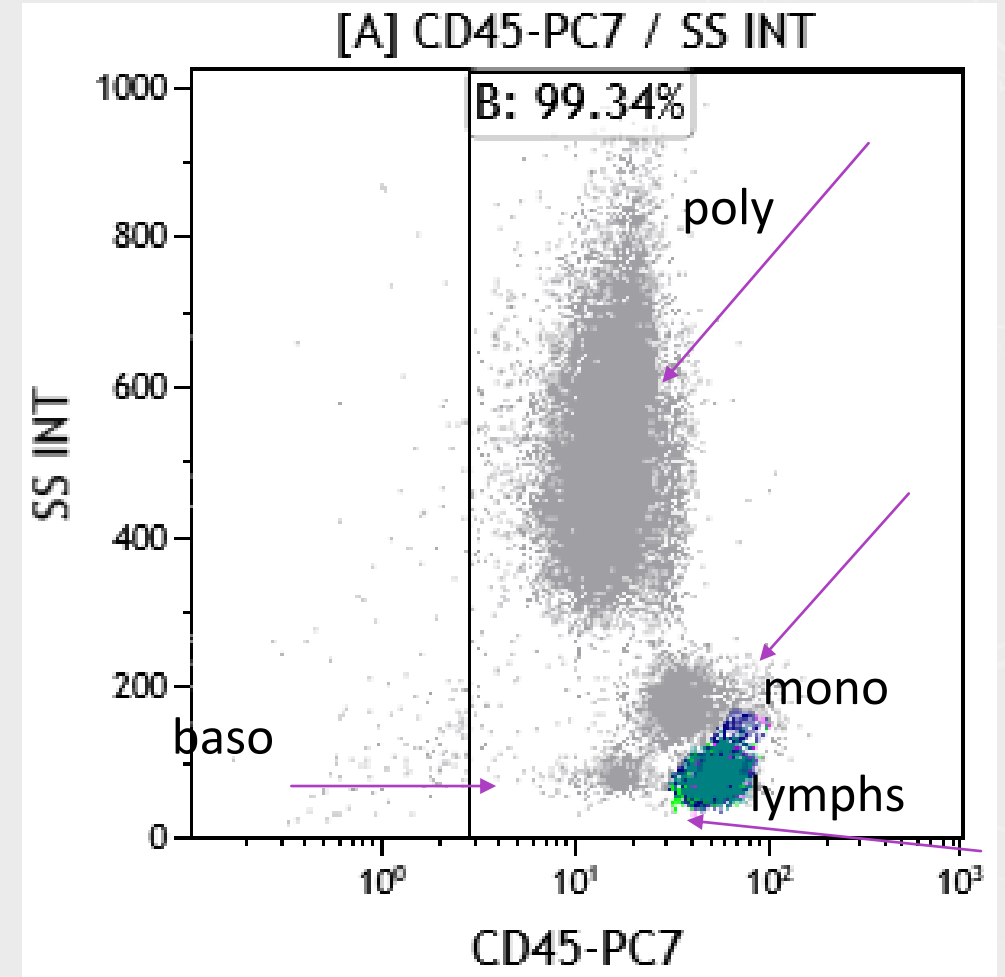
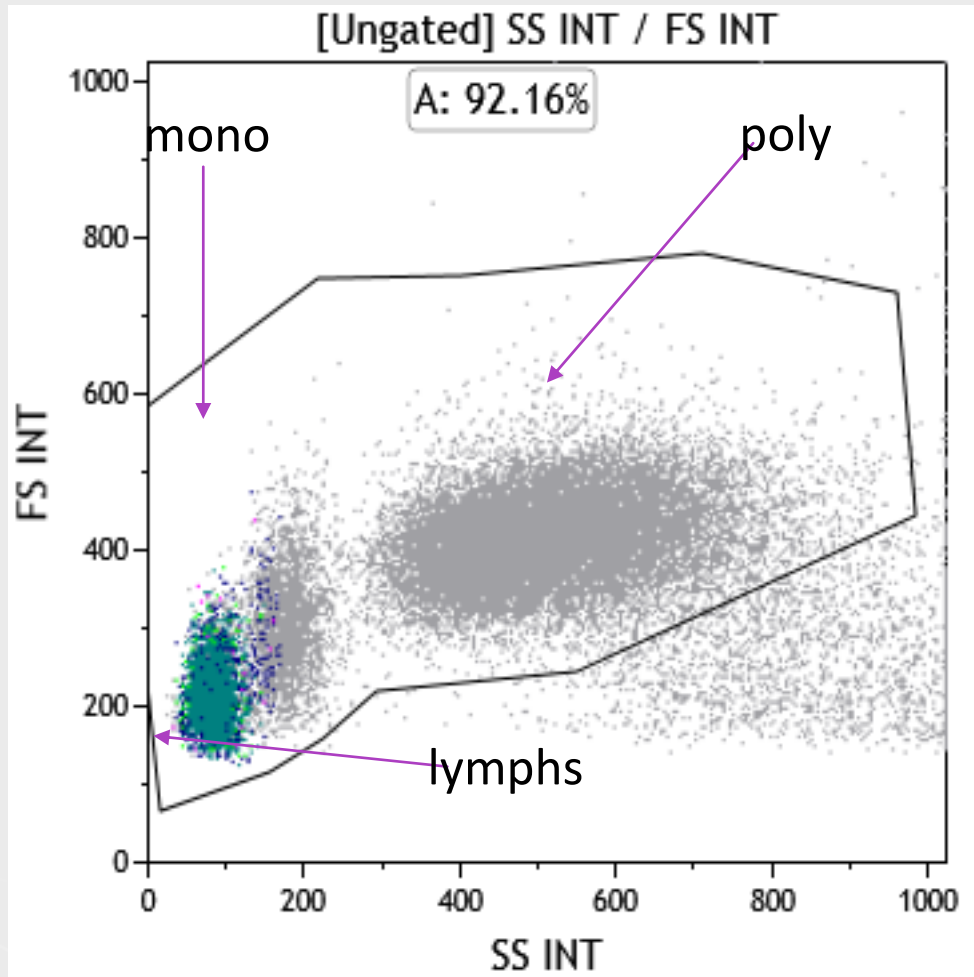
**ΟΡΙΟΘΕΤΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (GATING)**

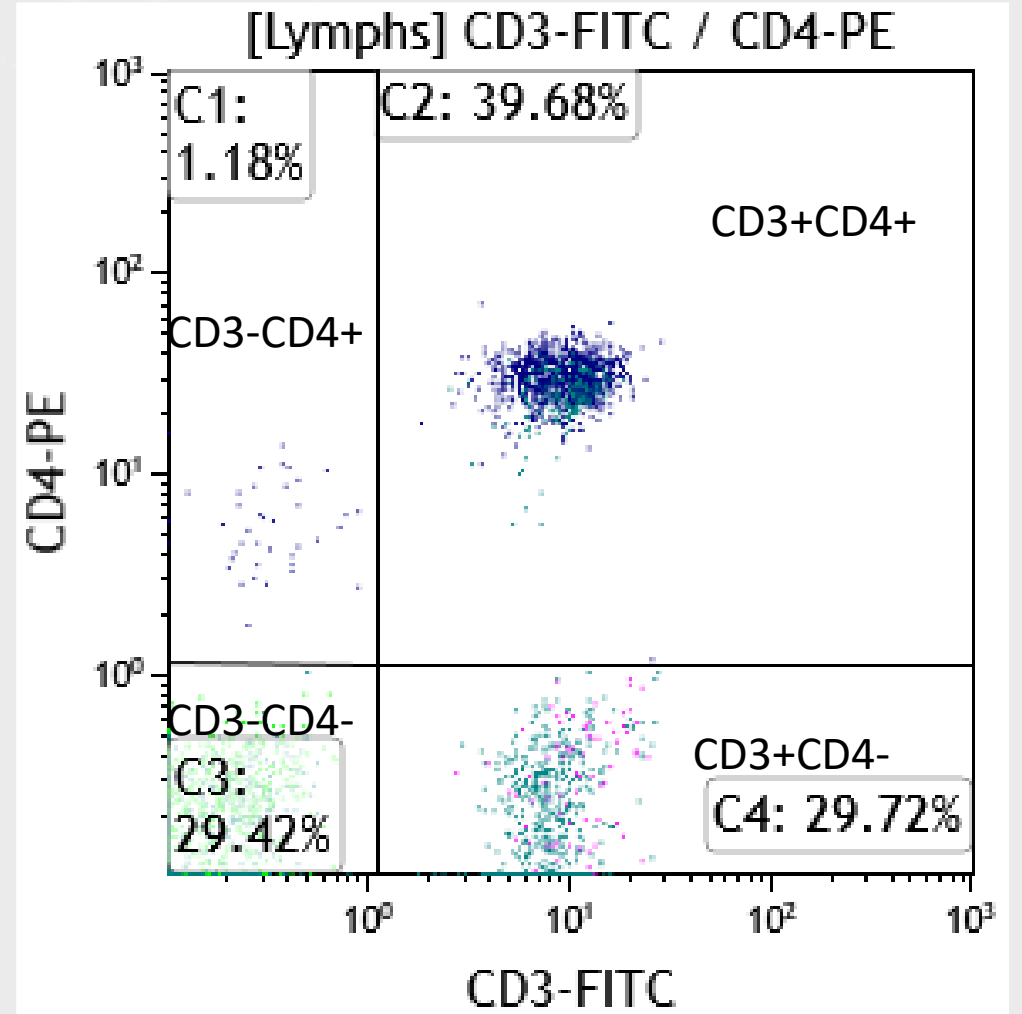
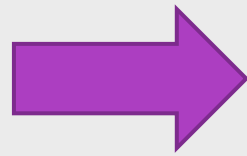
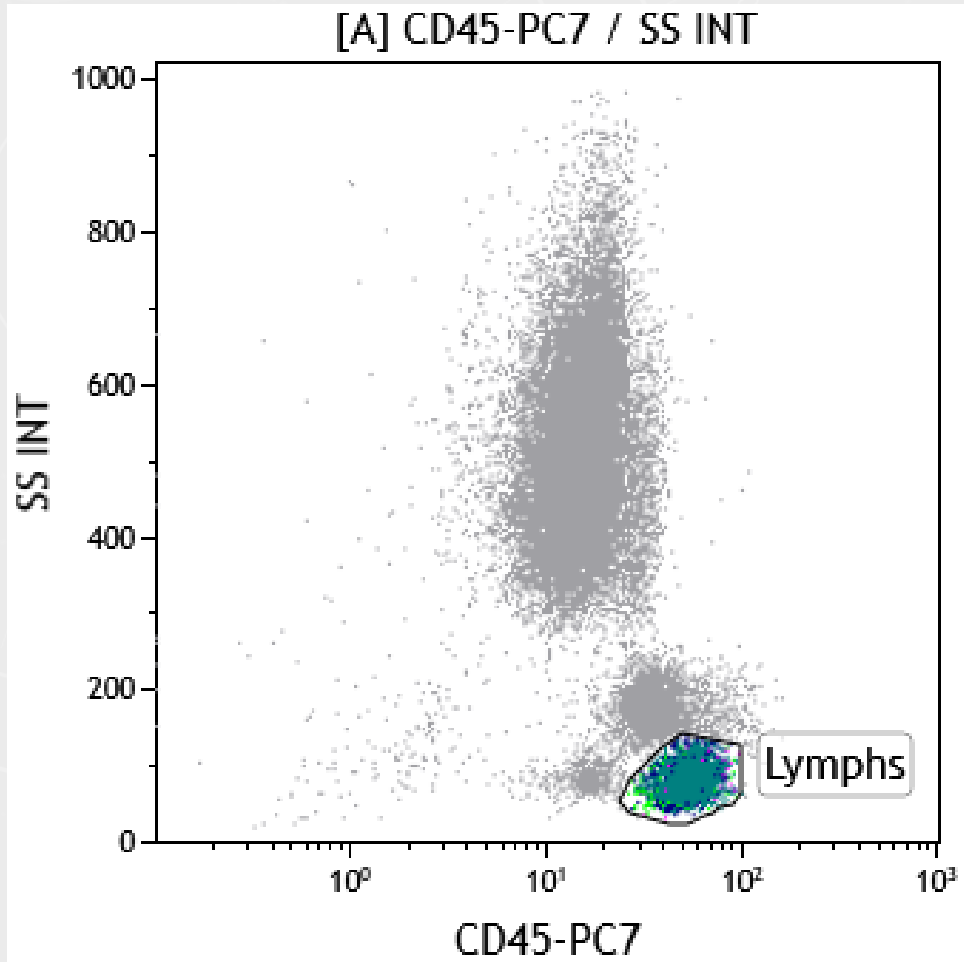
**ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

# ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ : ΣΚΕΔΑΣΗ SS/FS

ΣΚΕΔΑΣΗ – ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ SS/FL

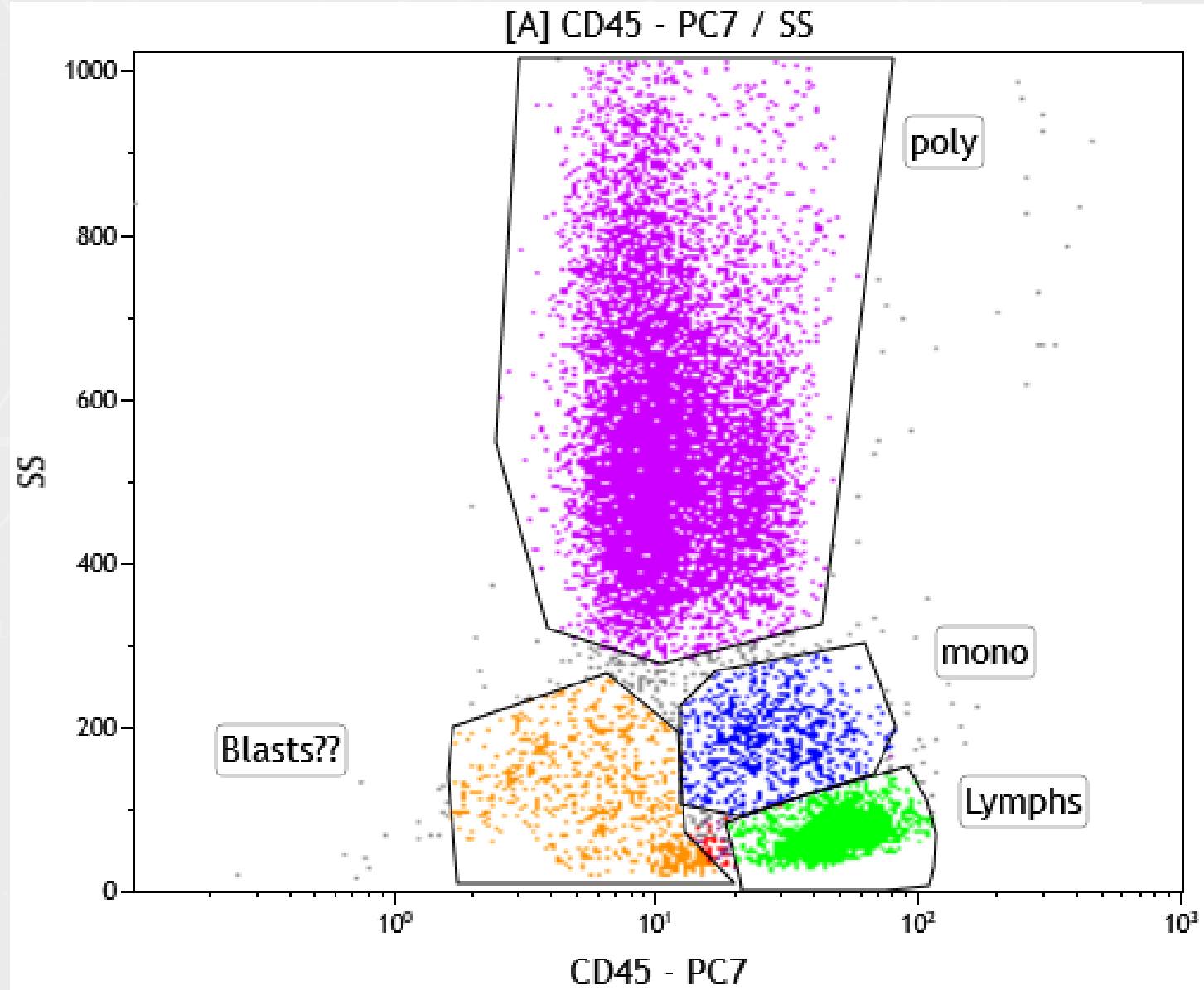






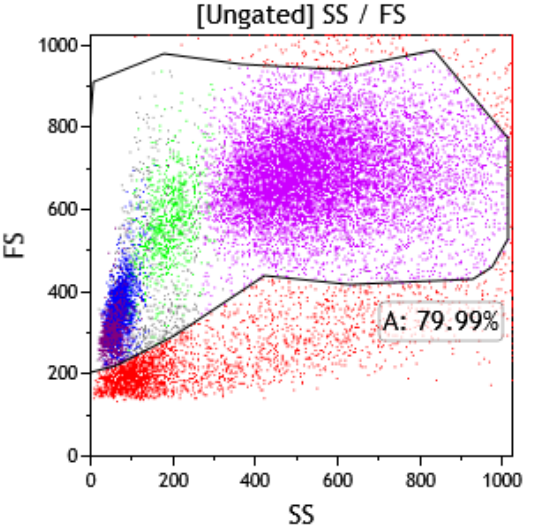
Μυελός

SS/CD45



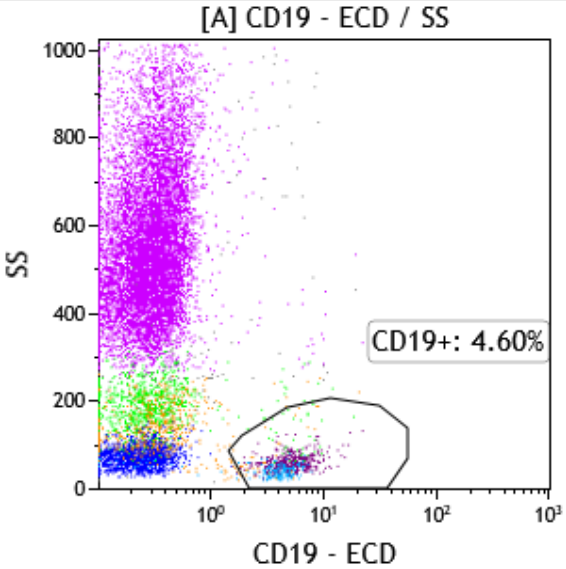
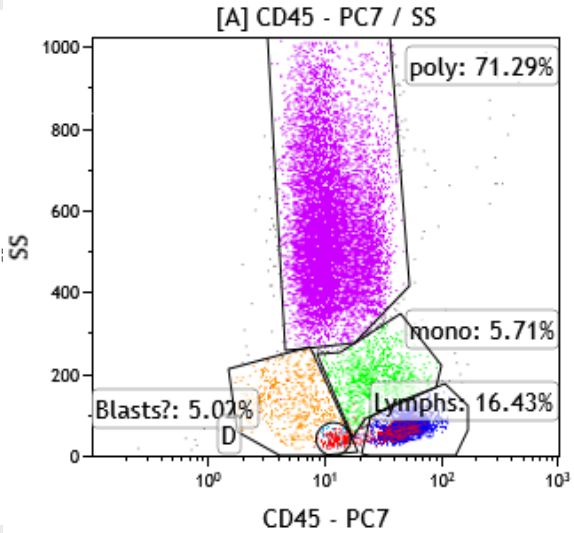
# ΟΡΙΟΘΕΤΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (GATING)

Real-time vs. software

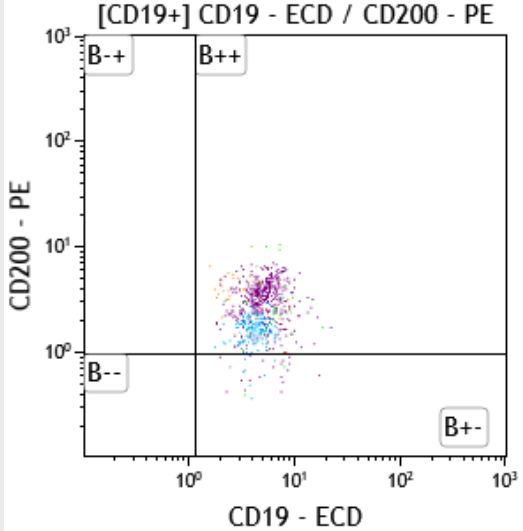


Προσδιορισμός  
Ορίων θετικότητας

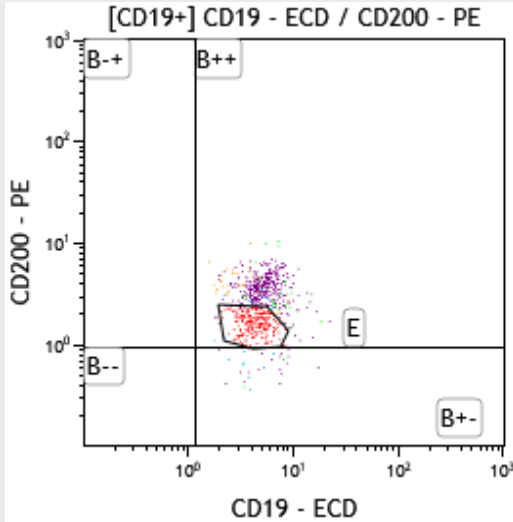
Στρατηγική οριοθέτησης



Ανάλυση



Back Gating



# Εφαρμογές Κυτταρομετρίας Ροής στα Κλινικά Εργαστήρια

Γρήγορη διάγνωση

**Αιματολογία:** Λευχαιμία / Λεμφώματα, Μυέλωμα, ΜΔΣ, ΡΝΗ παρακολούθηση – πρόγνωση (MRD), Έλεγχος προϊόντων Αιμοδοσίας, Σύνδρομα

Ορθότερη πρόγνωση

**Ανοσολογία** – Πρωτοπαθείς Ανοσοανεπάρκειες – Κυτταρική Ανοσία Καθ' έξιν αποβολές

**Μεταμόσχευση :** Διασταύρωση (Cross match), Αρχέγονα Αιμοποιητικά (HPC+), Ανοσιακή αποκατάσταση

Ευκολότερη απόφαση

**Λοιμώξεις :** HIV, COVID-19  
Ανίχνευση παθογόνων (HPV)

# Εφαρμογές Κυτταρομετρίας Ροής στα Κλινικά Εργαστήρια

Αλλεργίες

**Γρήγορη διάγνωση**

Έλεγχος εμβρυομητρικής αιμορραγίας

Μελέτη ΔΕΚ, Αιμοπεταλίων

**Ορθότερη πρόγνωση**

*Ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων*

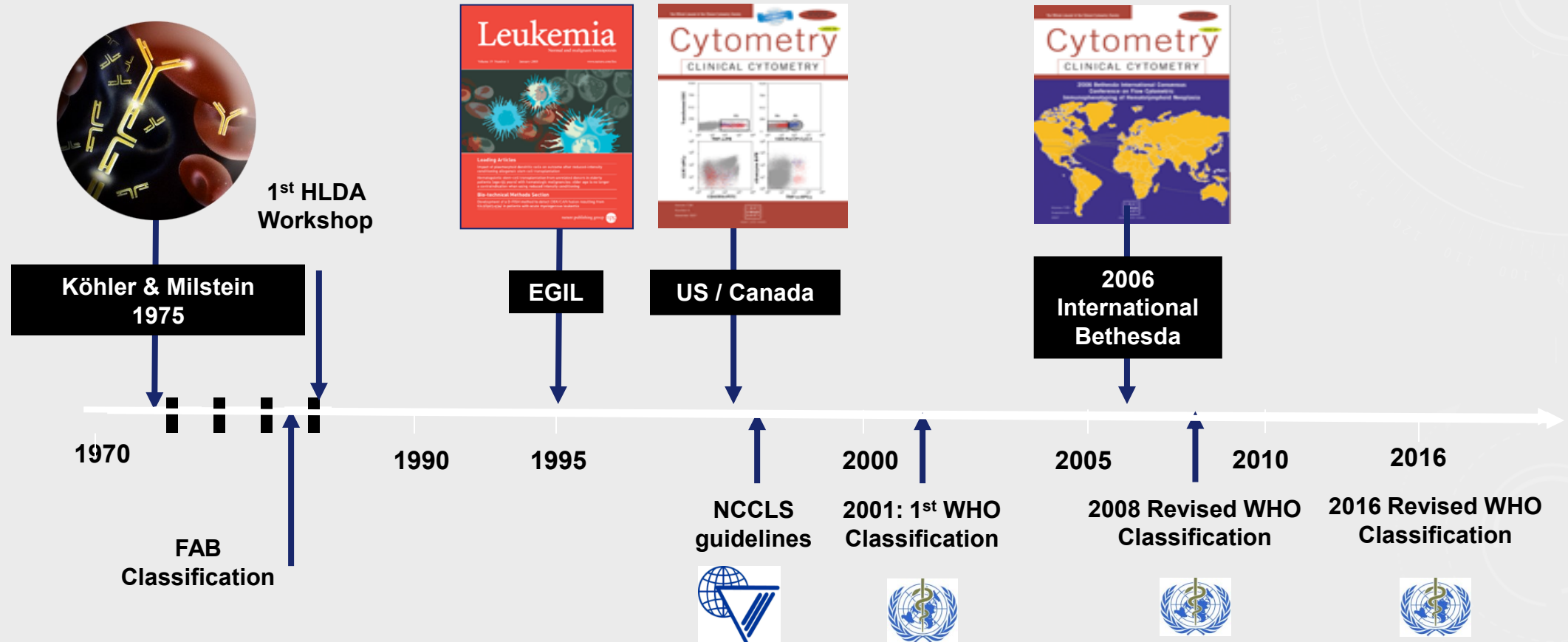
*Μελέτη κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών κυττάρων*

**Ευκολότερη απόφαση**

*Μελέτη μεσεγχυματικών κυττάρων*

*Μελέτη γονιδιακής έκφρασης (FLOW FISH)*

# ΟΜΟΦΩΝΙΑ ΣΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ: ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ & ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ



**Bethesda 2006 και WHO 2016**

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

Α) ΑΠΛΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ και  
HIV

Few technologies are more central to the investigation of and therapeutic development for infectious diseases than flow cytometry.

Capable of identifying and characterizing single cells based on cellular markers, this technology is critical to understanding immune responses to infection from pathogens and the pathology of cancer.

Further, the development of therapeutics to infections such as SARS-CoV-2 or personalized medicine approaches to cancer treatment benefit from this foundational technology.

**Jeremy Petravicz, PhD, Editor,  
Current Protocols**



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

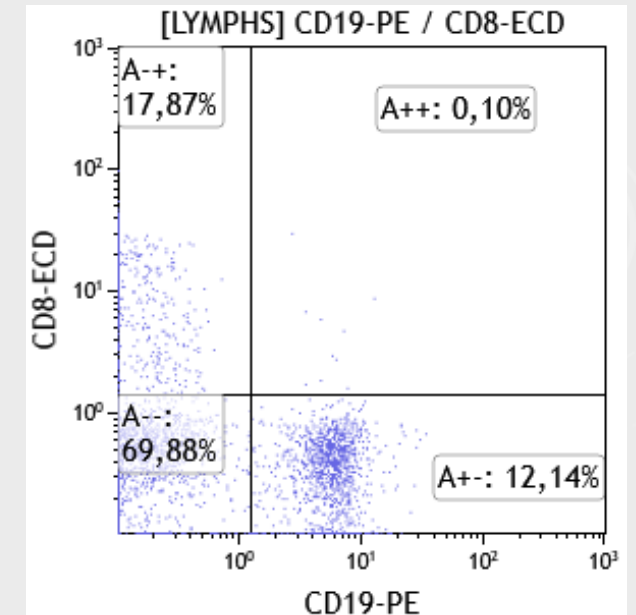
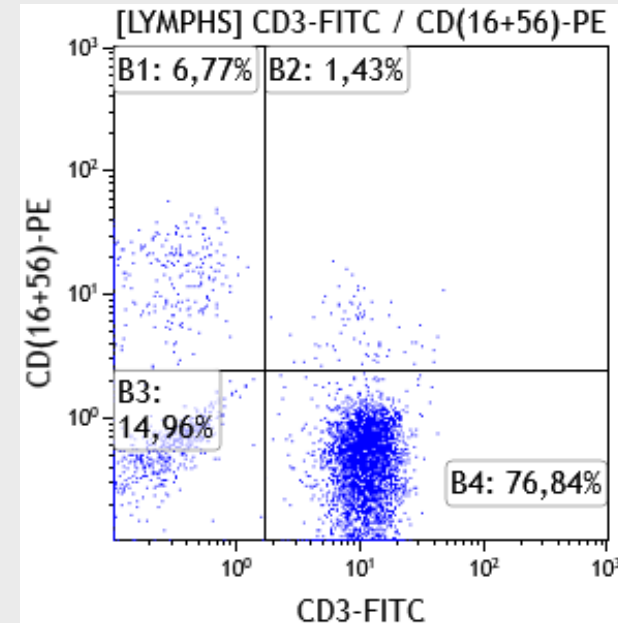
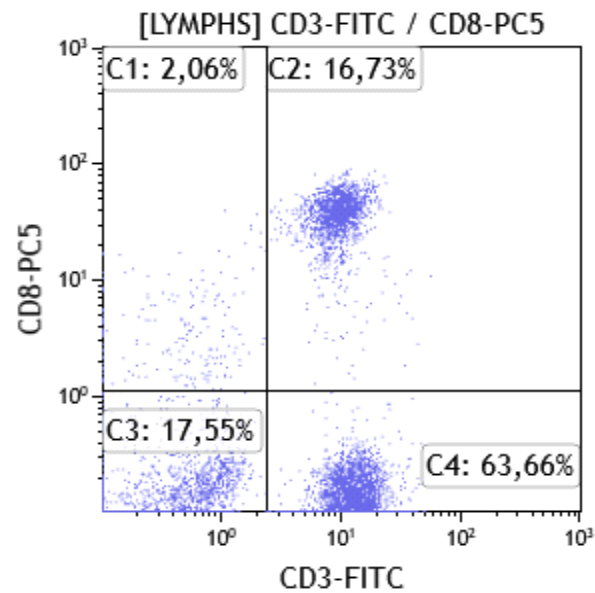
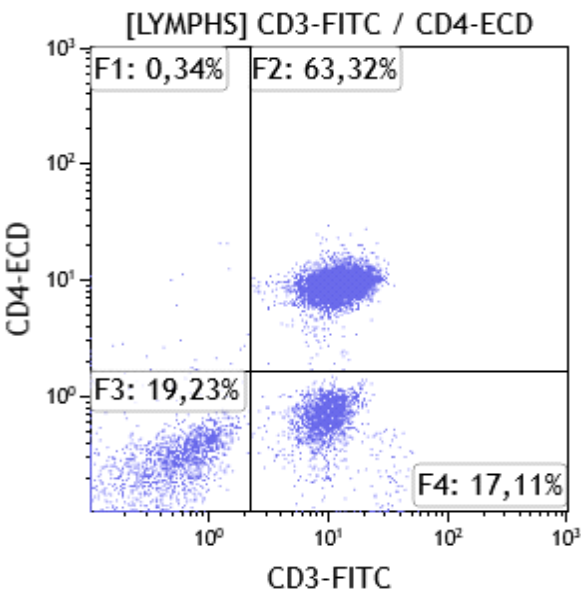
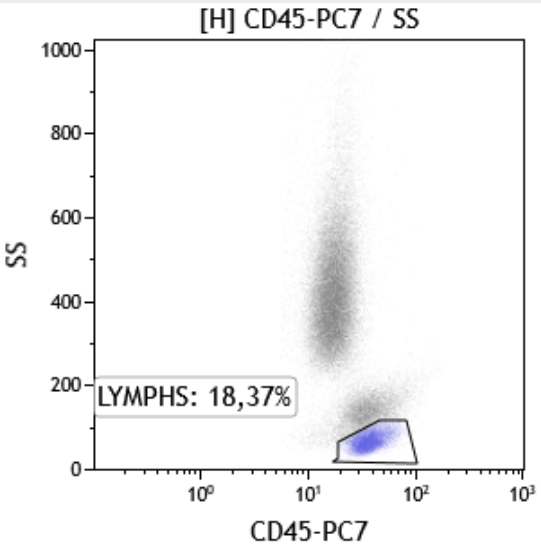
**T ΚΥΤΤΑΡΩΝ** : CD3, CD4, CD8

**B** : CD19

**NK** : CD16, CD56

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

CD45 (Παν-λευκοκυτταρικό)





## ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

### A) ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ – ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ - COVID 19



## What we need to know, what we have to do (1)

- 1) Cossarizza, A., De Biasi, S., Guaraldi, G., Girardis, M., Mussini, C. and (2020), SARS-CoV-2, the Virus that Causes COVID-19: Cytometry and the New Challenge for Global Health. *Cytometry*, 97: 340-343. doi:[10.1002/cyto.a.24002](https://doi.org/10.1002/cyto.a.24002)
  
1. The role of different components of innate immunity, such as monocytes, macrophages, dendritic cells, NK cells, and different innate lymphocytes, and their ability in controlling the early phases of the infection.
2. The production and utilization of cytokines, chemokines, and their receptors, which are crucial in the initial cytokine storm.
3. The kinetics of the humoral response and production of antibodies against the virus including those with neutralizing activity.
4. The importance of different types of B and plasma cells, considering the problems related to short- and long term memory.
5. The role of T-cell immunity, with the identification of eventual gross changes in CD4+ and CD8+ T cell populations that could have a prognostic meaning.
6. The specific T-cell response to different viral epitopes, which could allow a better characterization of the most antigenic parts of the viral proteins.
7. The importance of regulatory T-cells in modulating the response and controlling, or favoring, immunoactivation and suppression.



# Dry Reagent Technology For Rigorous Flow Cytometry To Investigate Adaptive Immune Responses

## Functional assays

Product	405 nm		488 nm					633 nm			
	PB	KrO	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AF647	AF700	AF750
IF T Activation B88649 (25 tests RUO)	CD4	-	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$	-	-	IL-2	-		CD8	CD3
IF T Helper Cell C04666 (25 tests RUO)	IL-17A	-	IFN $\gamma$	-	-	-	IL-4	CD4		-	CD3

	CONTAINED STIMULATING AGENTS	TESTED SAMPLE VOLUMES	ACTIVATION CHARACTERISTICS	MATCHING DURACLONE ANTIBODY PANEL
<b>DURActive 1</b> C11101 (25 tests, RUO)	PMA / Ionomycin / Brefeldin A	50 $\mu$ L heparinized whole blood  0.5x10 <sup>6</sup> PBMCs in 50 $\mu$ L suspension	Broad activation Inhibition of secretion	DURAClone IF T Activation (B88649) DURAClone IF T Helper Cell (C04666)
<b>DURActive 2</b> C11102 (25 tests, RUO)	PMA / Ionomycin		Broad activation	Detection of soluble compounds, DURAClone IF T Activation (B88649), DURAClone IF T Helper Cell (C04666) (using secretion inhibitors such as Monensin)

## Phenotyping assays

Product	405 nm		488 nm					633 nm				
	PB	KrO	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AF647	AF700	APC-AF700	APC-AF750
IM Phenotyping Basic Tube B53309 (25 tests RUO)	-	CD45	CD16	CD56	CD19	-	CD14	CD4	-	CD8	-	CD3
IM B Cell Tube B53318 (25 tests RUO)	IgM	CD45	IgD	CD21	CD19	-	CD27	CD24	-	-	-	CD38
IM T Cell Subsets Tube B53328 (25 tests RUO)	CD57	CD45	CD45RA	CCR7	CD28	PD1	CD27	CD4	-	CD8	-	CD3
IM Dendritic Cells Tube B53351 (25 tests RUO)	HLA-DR	CD45	CD16	Lineage**	-	CD1c	CD11c	Clec9A	-	-	CD123	-
IM TCRs Tube B53340 (25 tests RUO)	TCRV $\delta$ 2	CD45	TCRV $\delta$	TCR $\alpha\beta$	HLA-DR	-	TCRV $\delta$ 1	CD4	-	CD8	-	CD3
IM Treg Tube B53346 (25 tests RUO)	Helios	CD45	CD45RA	CD25	-	CD39	CD4	-	FoxP3	-	-	CD3
IM Granulocytes Tube B88651 (25 tests RUO)	CD15	CD45	CD294	-	CD16	CD33	CD11b	PD-L1	-	-	Lineage***	CD62L
IM Count Tube C00162 (25 tests RUO)	-	-	CD45	Counting Beads		7-AAD	-	-	-	-	-	-

\* : CD3 / CD19 / CD20 / CD14 / CD56

\*\* : CD3 / CD14 / CD19 / CD56

Quality Standard  
ISO9001 : 2015

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

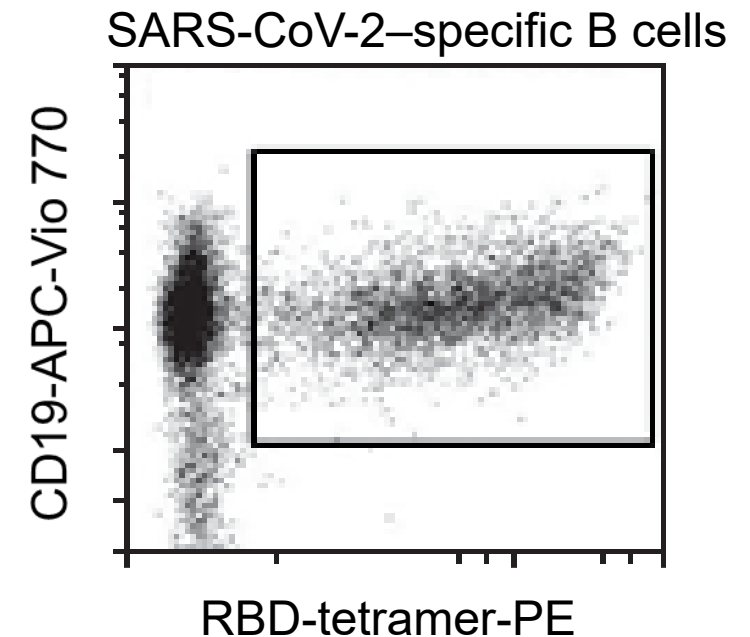
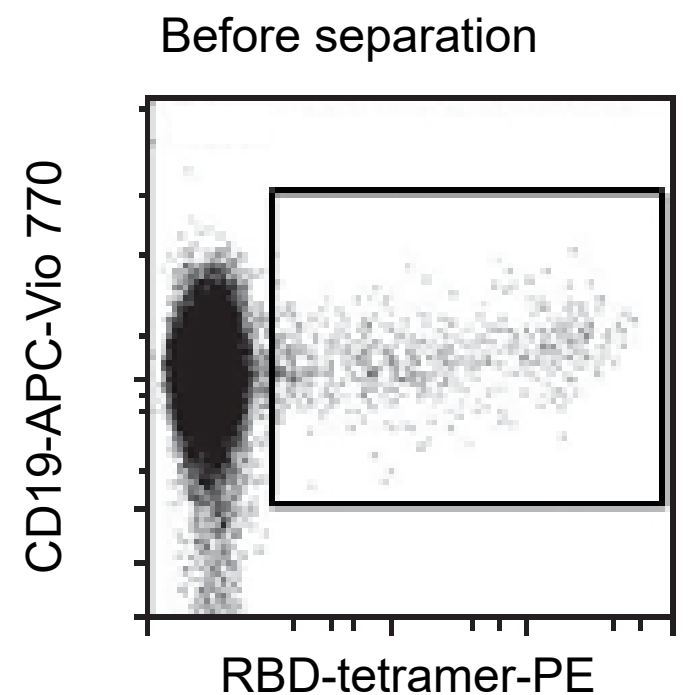


## SARS-CoV-2 RBD B Cell MicroBead Kit

### 3. Example of a separation using the SARS-CoV-2 RBD B Cell MicroBead Kit

B cells were enriched from human PBMCs from convalescent individuals using the REAlease CD19 MicroBead Kit, including the removal of the REAlease Complex. Then, SARS-CoV-2 RBD-specific B cells were isolated using the SARS-CoV-2 RBD B Cell MicroBead Kit, human, an MS Column, and a MiniMACS™ Separator.

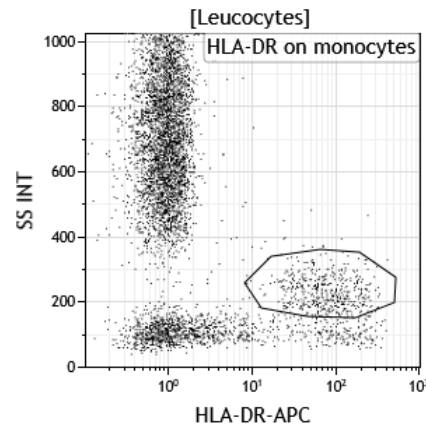
Cells were fluorescently stained with RBD-tetramer-PE and CD19-APC-Vio® 770 and analyzed by flow cytometry using the MACSQuant® Analyzer 10. Cell debris and dead cells were excluded from the analysis based on scatter signals and 7-AAD fluorescence.



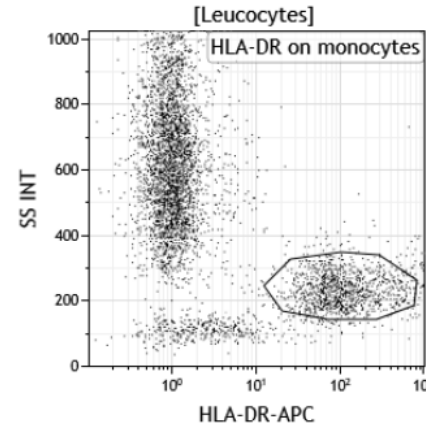


## mHLA-DR for a snapshot of the immune status

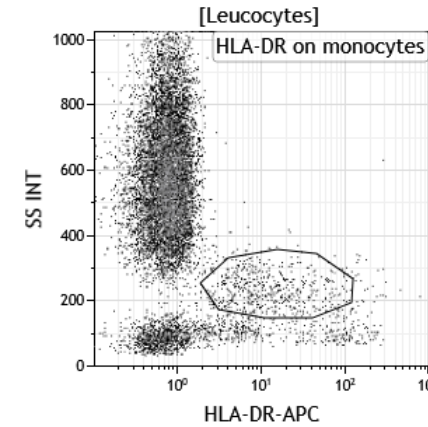
- HLA-DR monocyte expression provides a snapshot of the immune status after infection
- mHLA-DR levels increase immediately after infection, and subsequently decrease



Normal



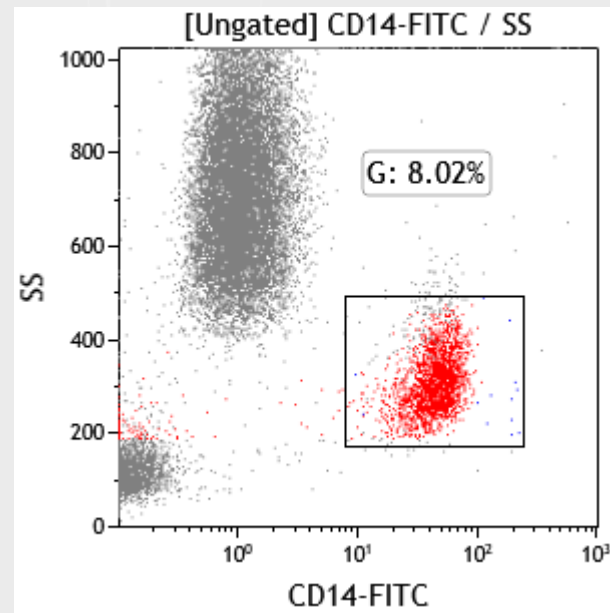
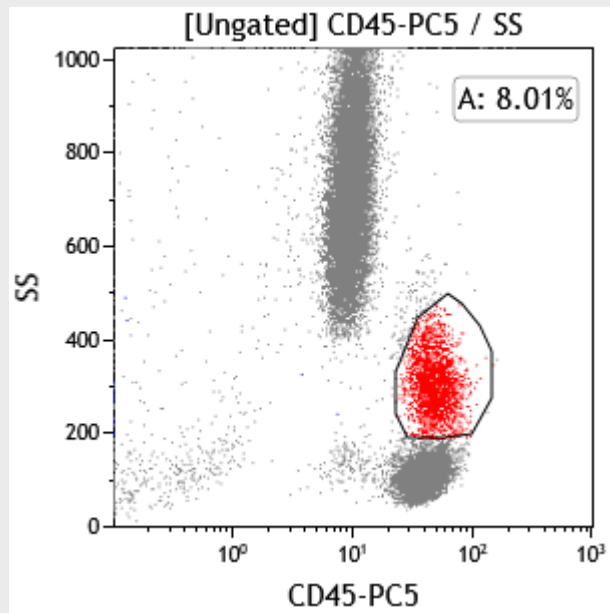
Recent stimuli  
Increased HLA-DR



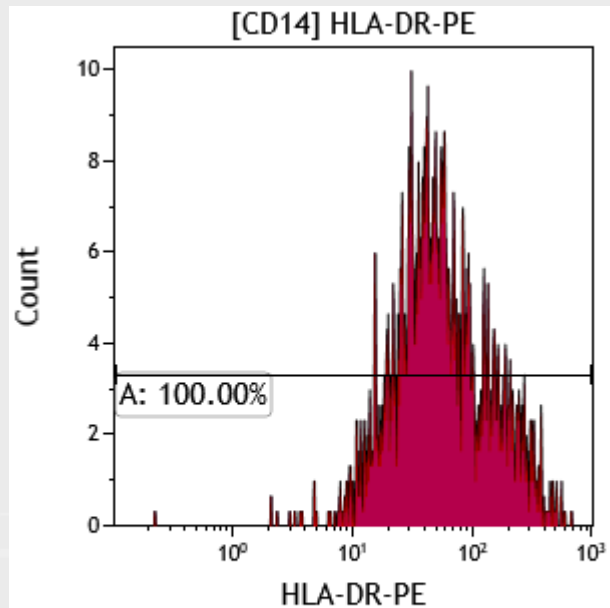
Immune Exhaustion  
Decreased HLA-DR

Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

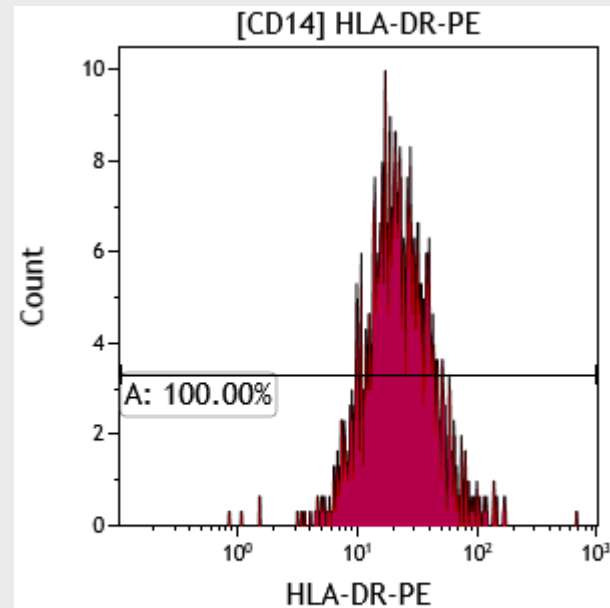
mCD169, nCD64 and HLA-DR allow visualization of the immune response to infection



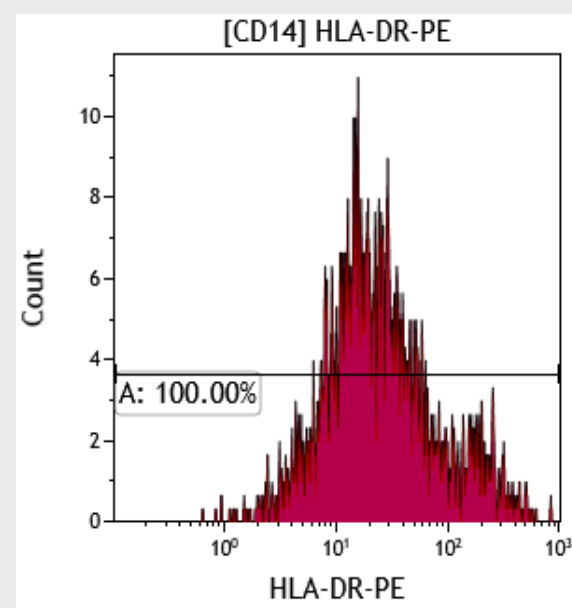
Δεδομένα από κλινικές μελέτες Δ'  
 Παθ/κης Κλινικής Αττικού Νοσοκομείου



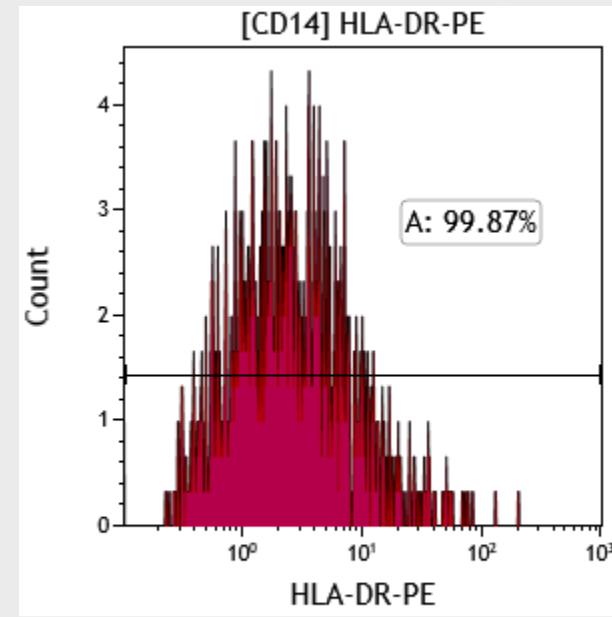
Gate X-Med	
All	50.88
A	50.88



Gate X-Med	
All	21.48
A	21.48



Gate X-Med	
All	22.03
A	22.03



Gate X-Med	
All	2.40
A	2.40



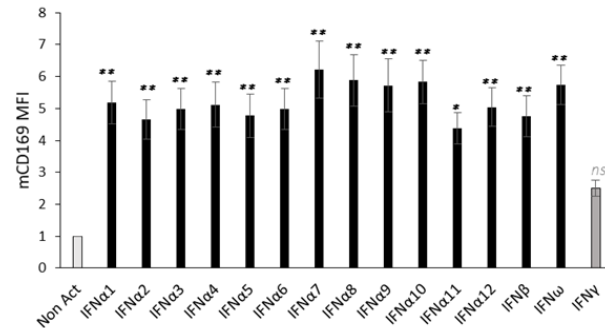
## First impressions are important and often long-lasting

- **“Immune imprint of infection”** by activation of markers on the immune cells by the interferons and cytokines
- Activated myeloid cells as early differential markers of infection
- Example: Used in TB testing (Quantiferon) (memory T cells)

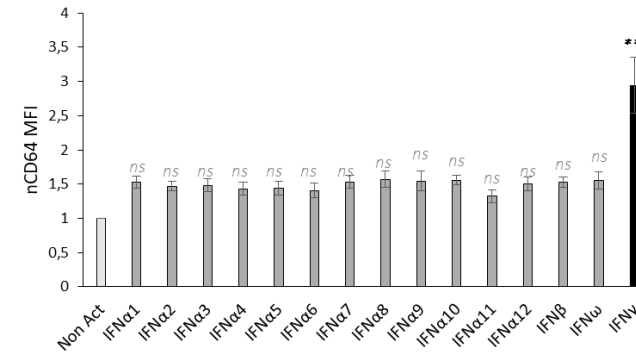
**Type I (IFN $\alpha$ ,IFN $\beta$ )** → **CD169 (Monocyte)**

**Type II (IFN $\gamma$ )** → **CD64 (Neutrophil)**

- mCD169: Receptor for viral proteins and lipids and marker for Type I IFN signal
- nCD64: established marker for bacterial infections and marker for Type II IFN signal



mCD169 is specifically upregulated by Type I IFN (IFN $\alpha$ , $\beta$ )



nCD64 is specifically upregulated by Type II IFN (IFN $\gamma$ )

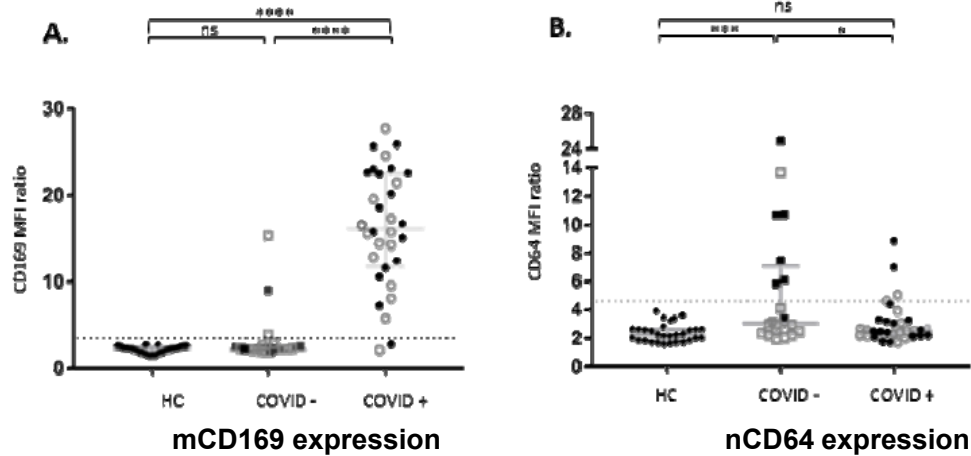
CD169, CD64 are differential markers of interferon response



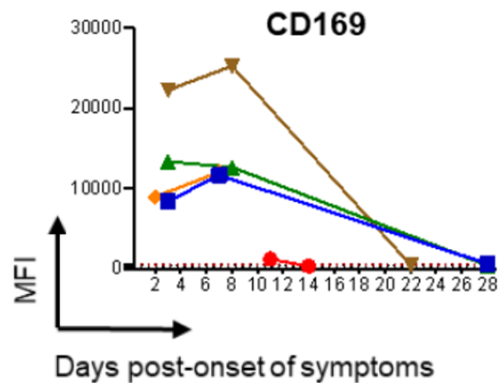




# What about mCD169 in COVID?



Increase in monocyte CD169 in COVID +ve cases detected by flow cytometry



- Bedin, AS, et al. Monocyte CD169 expression as a biomarker in the early diagnosis of COVID-19. Preprint at *medRxiv*
- Vetter, P. et al Daily viral kinetics and innate and adaptive immune responses assessment in COVID-19: a case 1 series. Preprint at *medRxiv*
- Aschenbrenner, AC. et al. Disease severity-specific neutrophil signatures in blood transcriptomes stratify COVID-19 patients. Preprint at *medRxiv*

This article is a preprint and has not been peer-reviewed. It reports new medical research that has yet to be evaluated and so should *not* be used to guide clinical practice.

CD169 has been identified as biomarker in the early diagnosis of COVID-19





# Visualizing immune response during infections

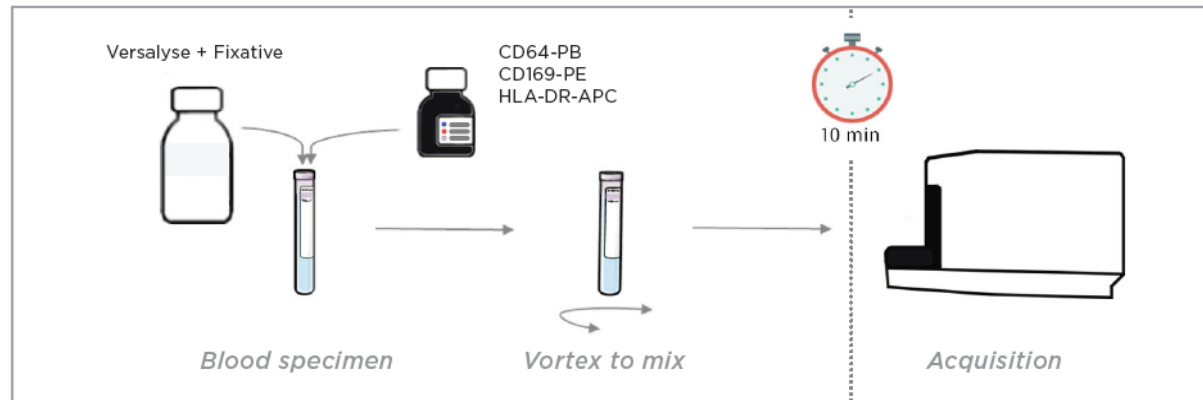
IOtest Myeloid Activation

CD169-PE/HLA-DR-APC/CD64-PB Antibody Cocktail, RUO

FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC-A700	APC-A750	PB	KrO
	CD169				HLA-DR			CD64	

- Screen the immune response to infections
- Ready to use mix, pre-titrated
- Open channels for drop-ins
- Rapid (10 min), Easy to use

**Bacterial Infection: nCD64 Overexpression**  
**Viral Infection: mCD169 overexpression**  
**Additional marker of Immune status:**  
**Recent stimuli: increased HLA-DR,**  
**Immune exhaustion: decreased HLA-DR**



One step, no wash, no compensation



Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Internal | Company Confidential

**TABLE 2** The role of regulatory cells during chronic and acute infection

Virus strain	Function of Treg cells during chronic infection	Reference PMID
HCV	CD25+ FOXP3+ Treg population suppress HCV core-specific CD4+ and CD8+ T-cell immune responses	23,710,581
LCMV	Absence of IFNAR signaling in Tregs results in decreased CD8+ effector T cells, enhance T effector cell exhaustion, defective generation of antiviral memory CD8+ T cells, and enhanced LCMV persistence	29,672,594 24,711,580
HIV	Treg cells control HIV replication in activated T cells through a cAMP dependent mechanism	21,436,067
HBV	Selective depletion of Tregs significantly increase HBV-specific CD8+ T cell responses and accelerate viral antigen clearance The imbalance of Treg/Th17 may link to HBV disease progression	26,986,976 22,548,790
Murine AIDS	Timed ablation of Treg cells can prevent murine AIDS progression	15,067,071
HSV-1	CD25+ Treg cells play a beneficial role to minimize viral immunological lesions HSV infection results in increased Treg cells function with such cells able to suppress CD8+ T cell responses to both viral and unrelated antigens Treg cells play a critical role in both HSV-1 latency and reactivation via suppressing anti-viral CD8+ T cells	12,975,455 15,034,024 30,485,807
HSV-2	Tregs facilitate early protective responses to local viral infection by allowing a timely entry of immune cells into infected tissue CTLA-4 expression by Tregs is critical to promote proper DC migration from the infected tissues and initiating an appropriate antigen-specific CD4 T-cell response	18,436,744 27,007,674
Friend Retrovirus	CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress CD8+ T cells function and contribute to viral persistence	16,517,701 16,981,182
Vaccinia virus	Treg cells influence CD8+ T cells immunodominance hierarchies	15,749,866
Virus strain	Function of Treg cells during acute infection	Reference
Influenza A virus (IAV)	Treg cells are critical for influenza A virus clearance in neonatal mice Treg depletion enhances CD8 T cells responses to influenza A virus infection Notch4 signaling limits regulatory T-cell-mediated tissue repair and promotes severe lung inflammation after H1N1 infection	26,501,792 15,749,866 33,915,108
Respiratory syncytial virus (RSV)	Neonatal RSV A2 infection rapidly induces Treg cells suppressive functions to dampen the Th2 and Tc2 responses Treg cells expressing granzyme B can control lung inflammation during acute infection RSV vaccination attenuates airway Treg cells responses to RSV infection	33,909,707 2,223,699 2,338,220
West Nile virus (WNV)	Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection	19,855,131

**PHENOTYPE REPORTS**

Comprehensive phenotyping of mouse regulatory T cells relevant to viral infections

Qian Chen<sup>1,2</sup> | Mehdi Benamar<sup>1,2</sup>  
| Tsz Man Fion Chan<sup>1,2</sup> | Muyun Wang<sup>1,2</sup> |  
Talal A. Chatila<sup>1,2</sup>

Received: 24 February 2022 Revised: 6 April 2022 Accepted: 5 May 2022  
DOI: 10.1002/cyto.a.24655



# ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

## Β) ΛΕΜΦΟΪΠΕΡΠΛΑΣΙΕΣ

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

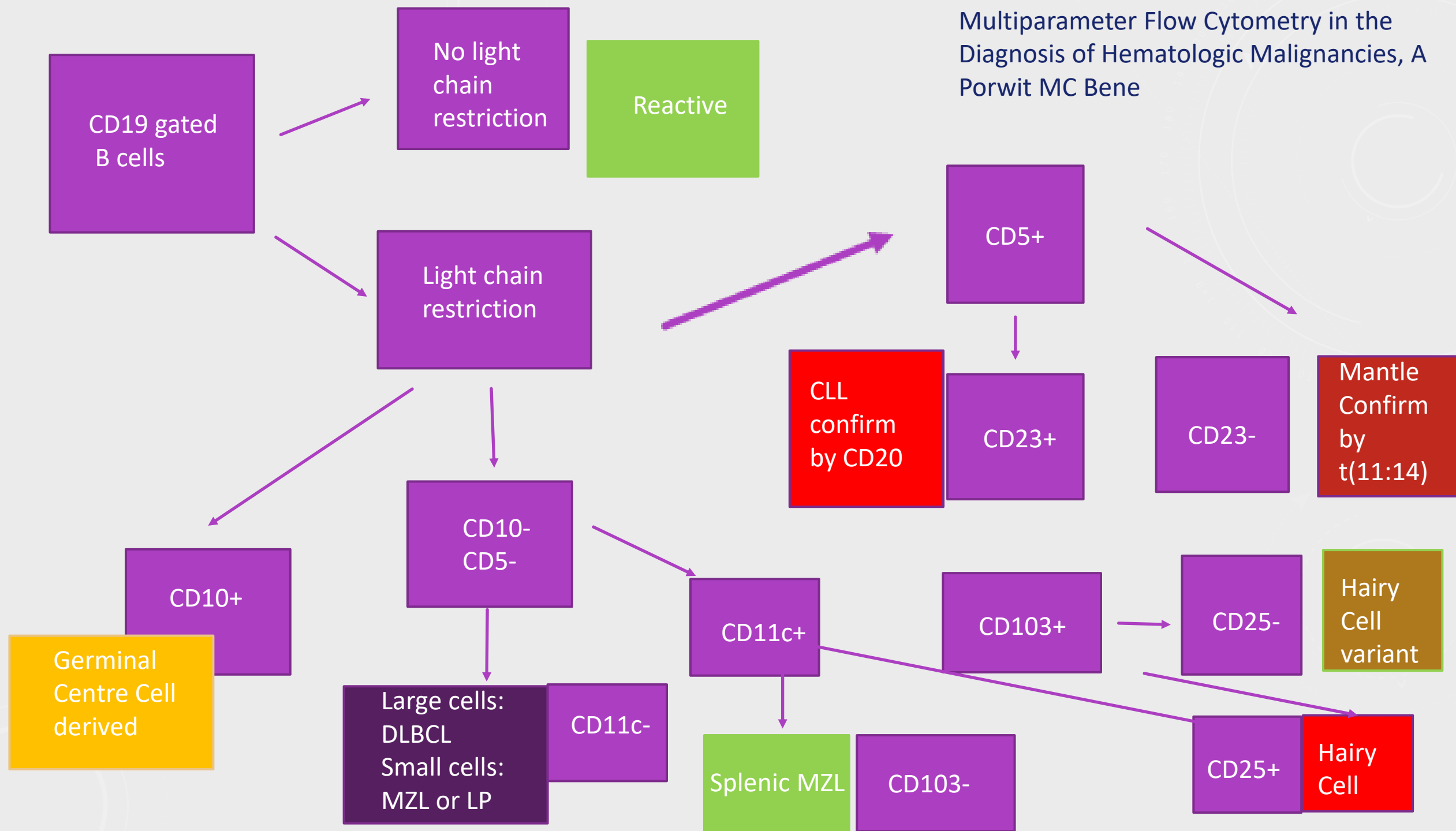
Γενικότερα διερευνητικά πρωτόκολλα

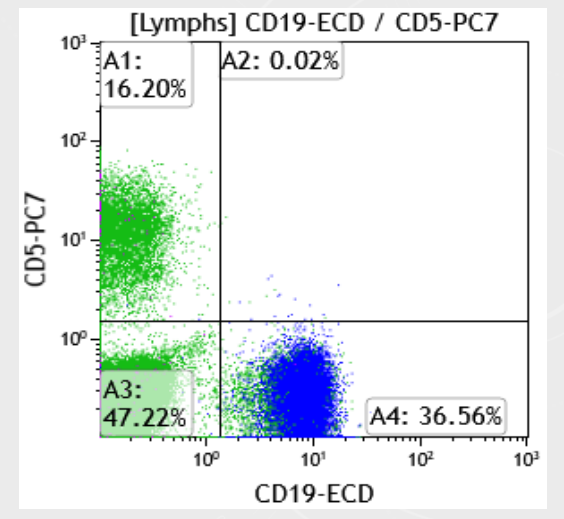
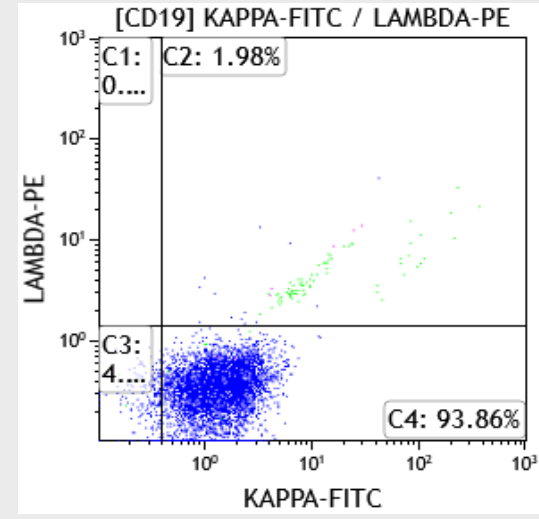
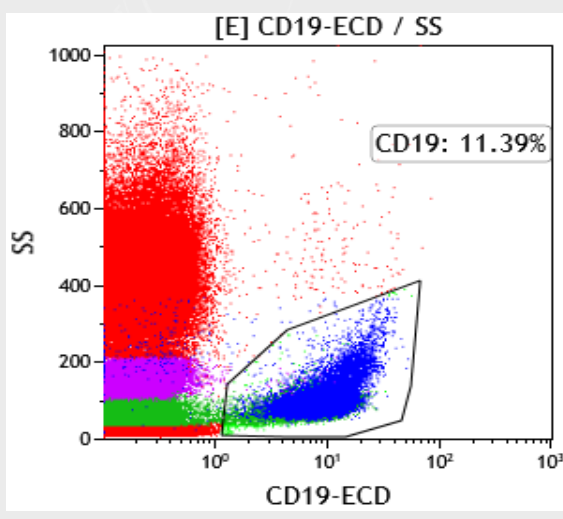
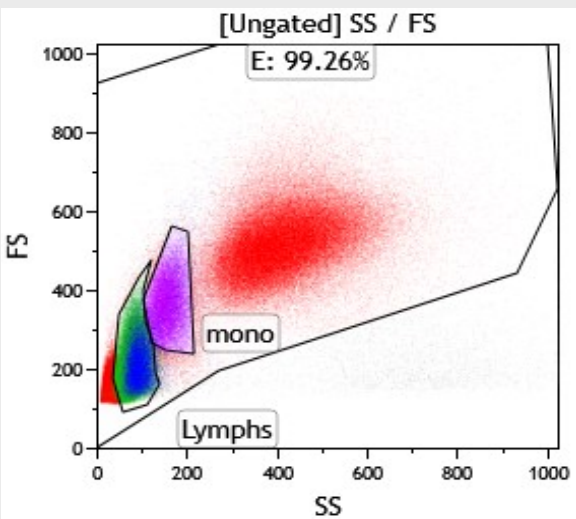
CD45, DR, CD3, CD5, CD4, CD8, CD19, CD10, CD20, CD22, κ, λ

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)

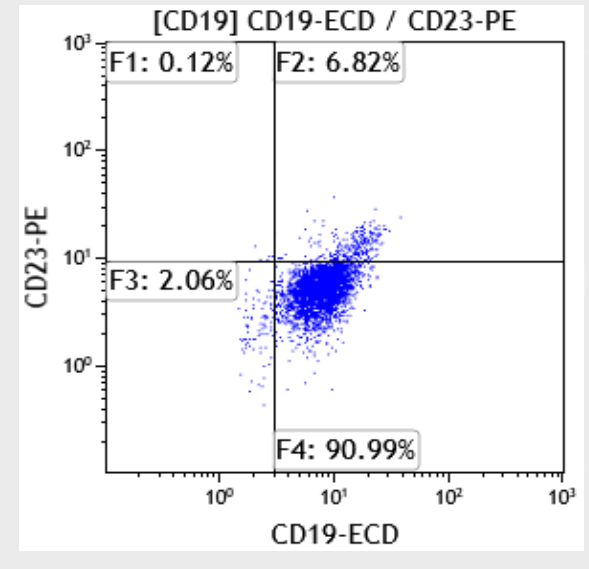
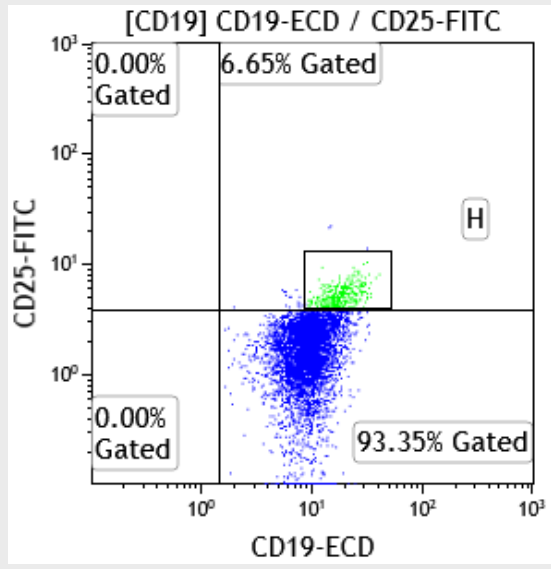
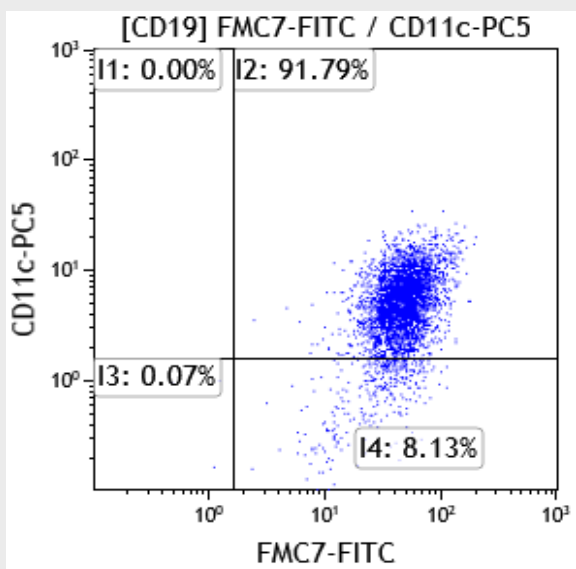
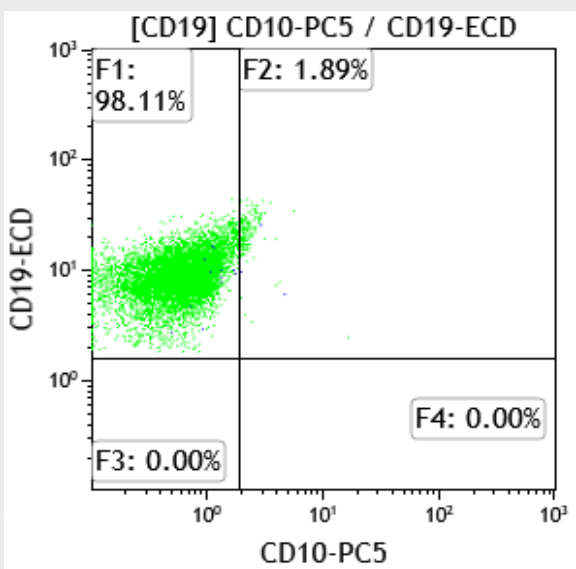
# Multiparameter Flow Cytometry in the Diagnosis of Hematologic Malignancies, A Porwit MC Bene



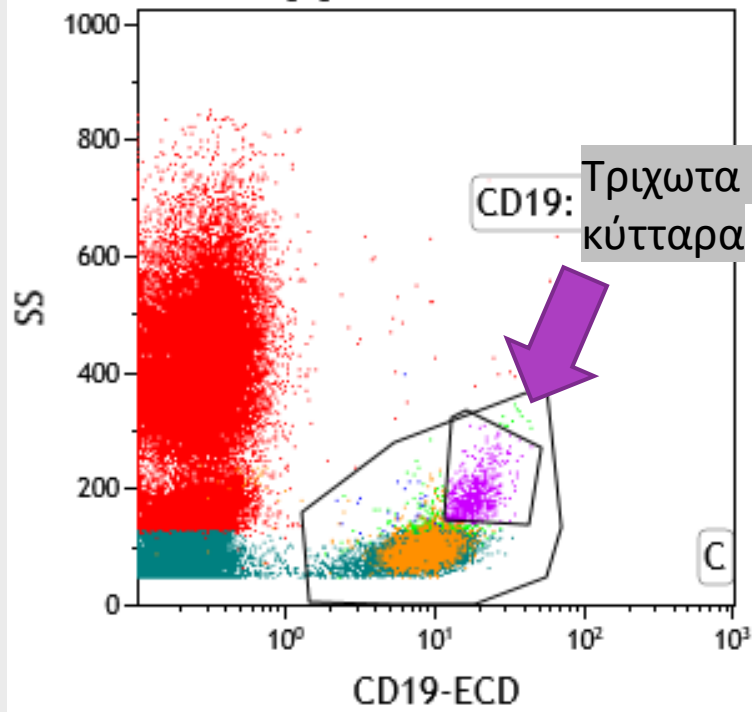


# ΑΝΑΛΥΣΗ Β -ΛΕΜΦΟΪΠΕΡΠΛΑΣΙΑΣ

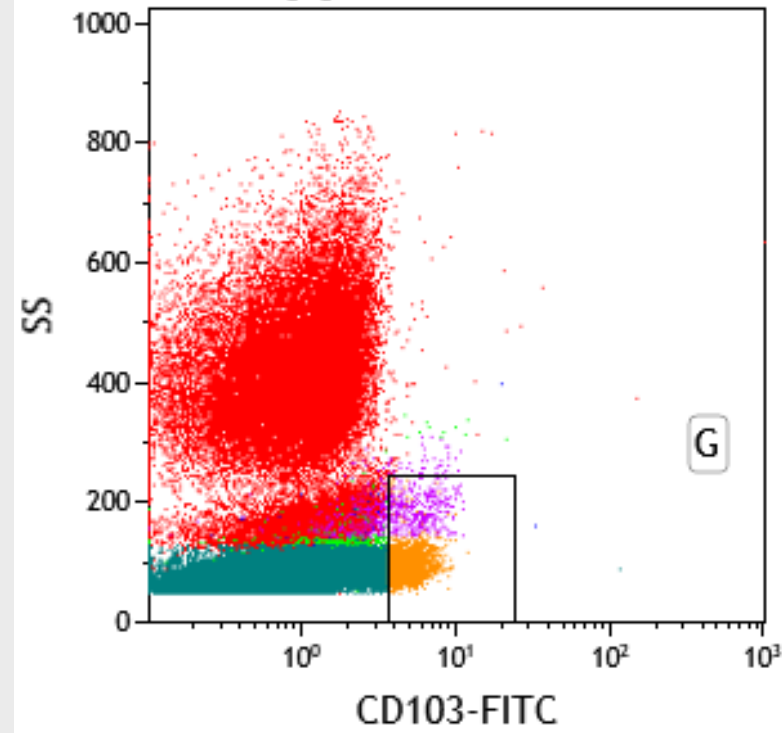
Τριχωτή Λευχαιμία?



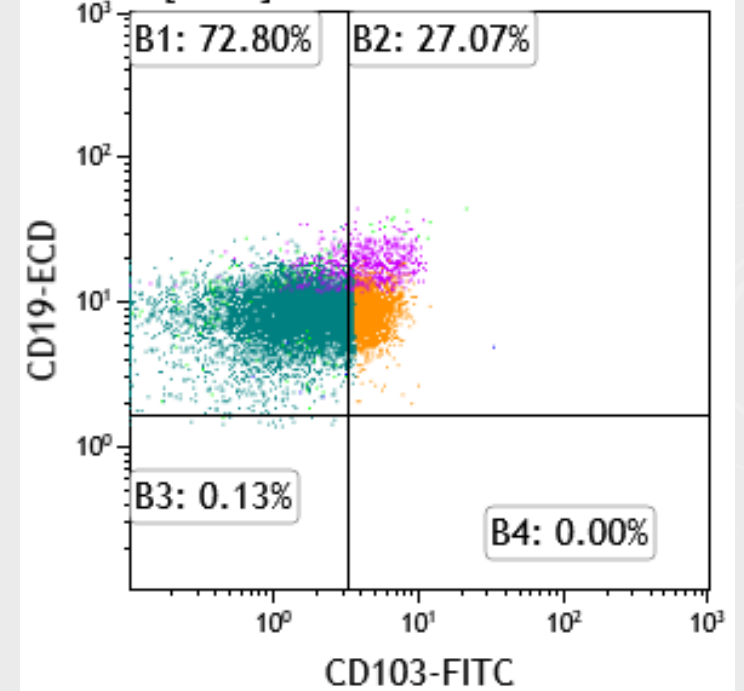
[E] CD19-ECD / SS



[E] CD103-FITC / SS

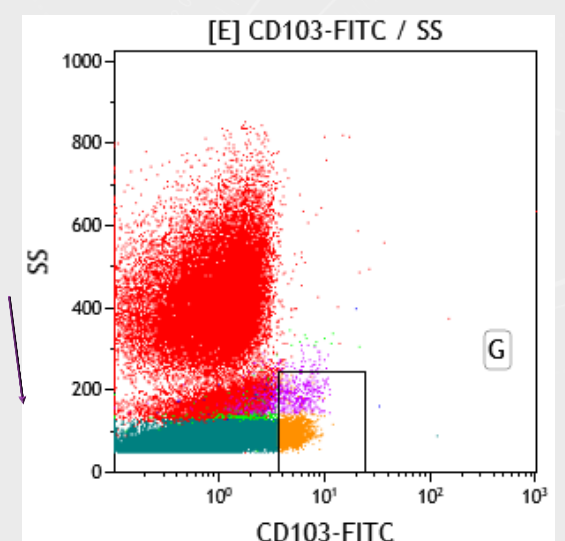
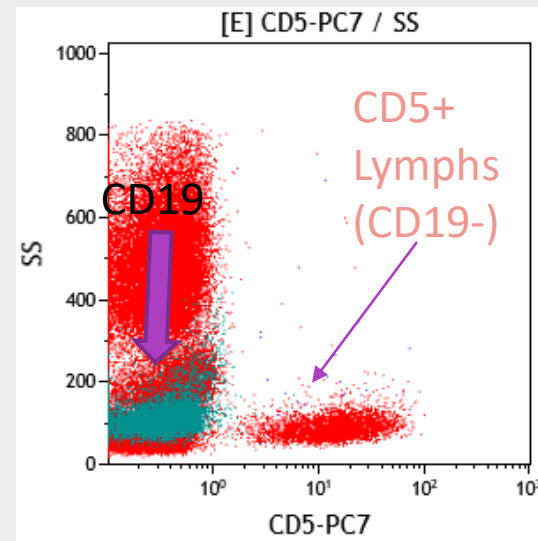
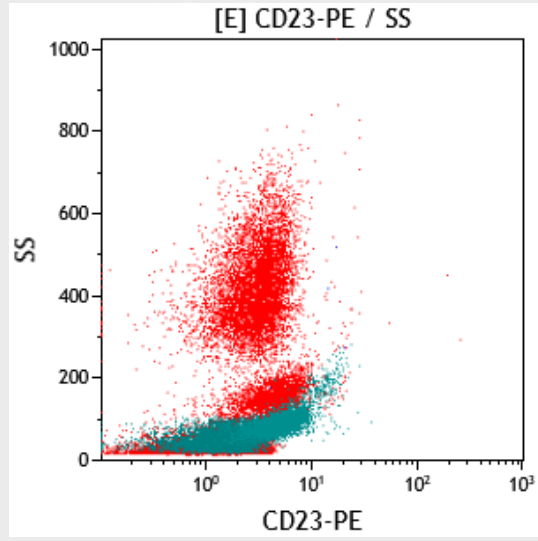
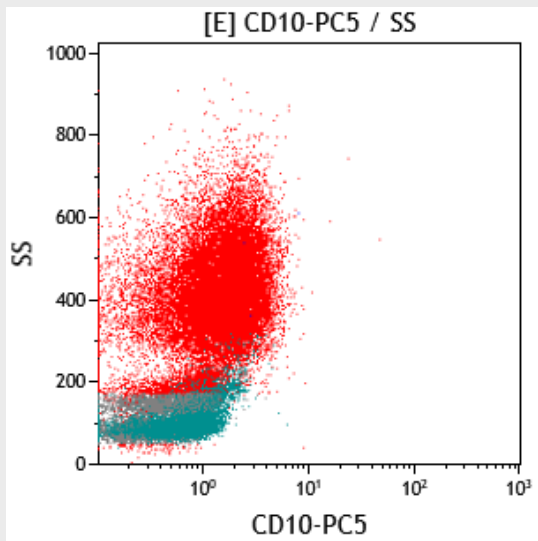


[CD19] CD103-FITC / CD19-ECD

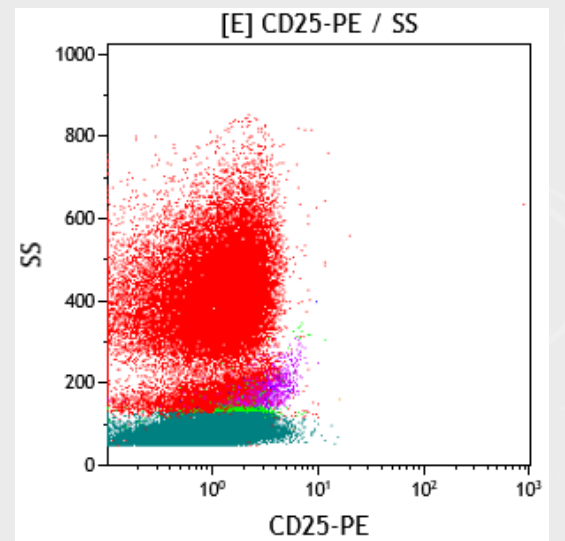
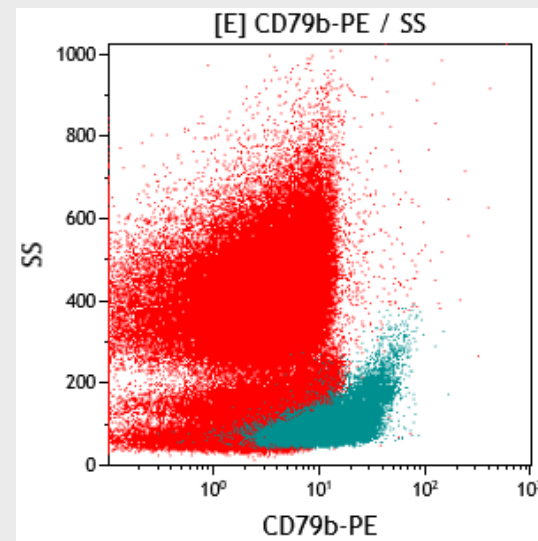
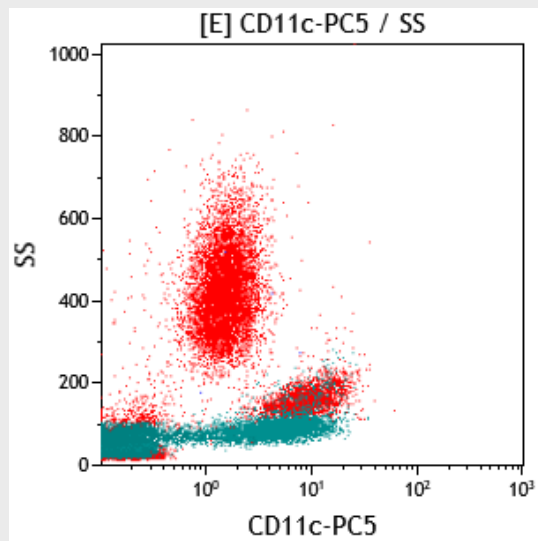
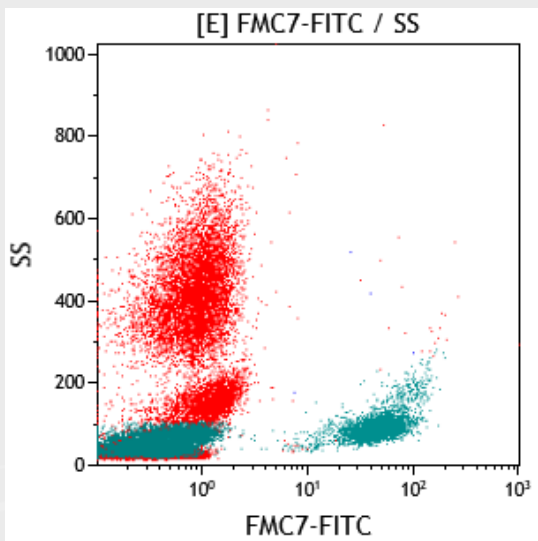


ΤΡΙΧΩΤΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ,  
ΕΚΦΡΑΣΗ CD103+





## 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**

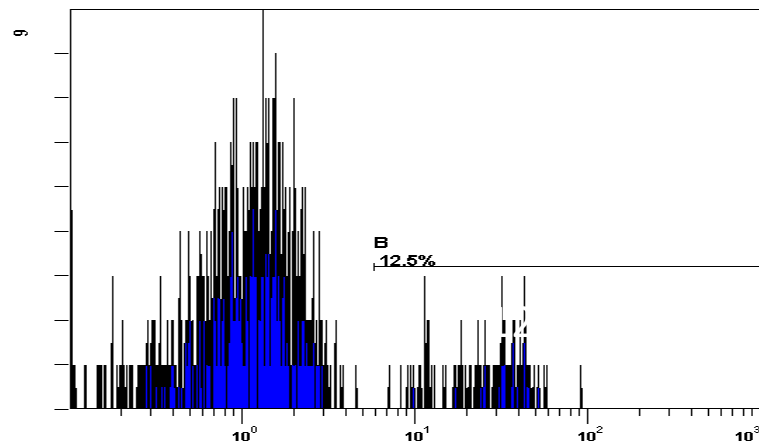


# ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

## Γ) ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

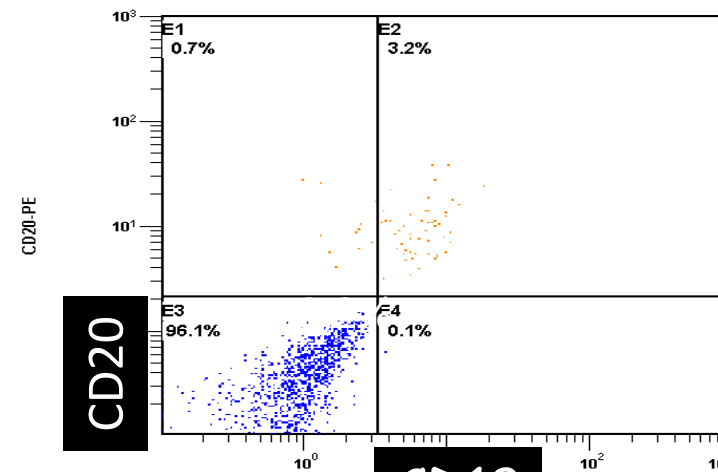
# Η κυτταρομετρία ροής στην ανοσοανεπάρκεια

(F1)[A] MOUSOULIS2 10\_02\_09 CD3 CD4 CD8 CD45 00026387 2009-02-10.LMD : FL1 Log - ADC



CD3

(F1)[A] MOUSOULIS2 10\_02\_09 CD19 CD20 CD45 00026389 2009-02-10.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC

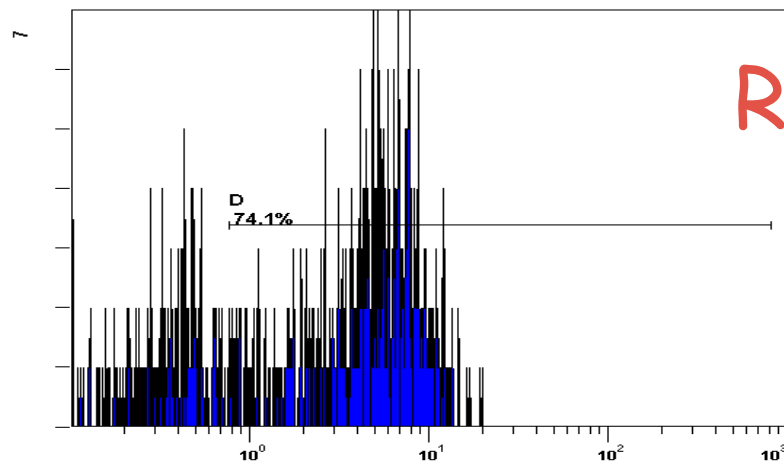


CD20

CD19

T-B-NK+ SCID

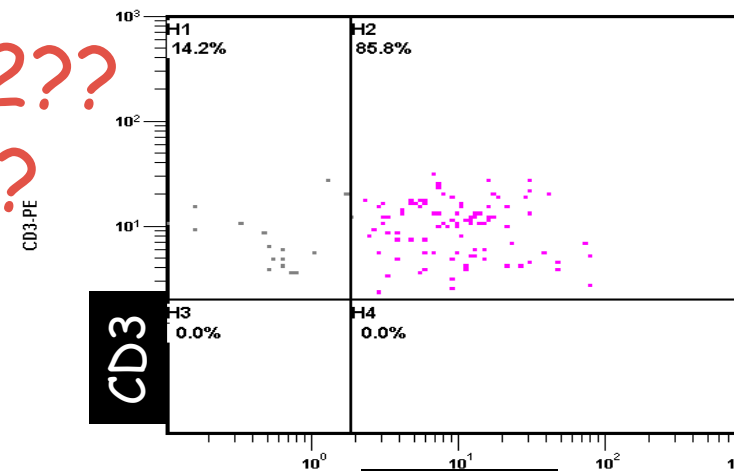
(F1)[A] MOUSOULIS2 10\_02\_09 CD3 CD56 CD16 CD45 00026390 2009-02-10.LMD : FL3 Log - ADC



CD16

RAG1/RAG2??  
Artemis??

[A AND C] MOUSOULIS 10\_02\_09 CD3 HLADR CD19 CD45 00026370 2009-02-10.LMD : FL1 Log/FL2 Log - AI

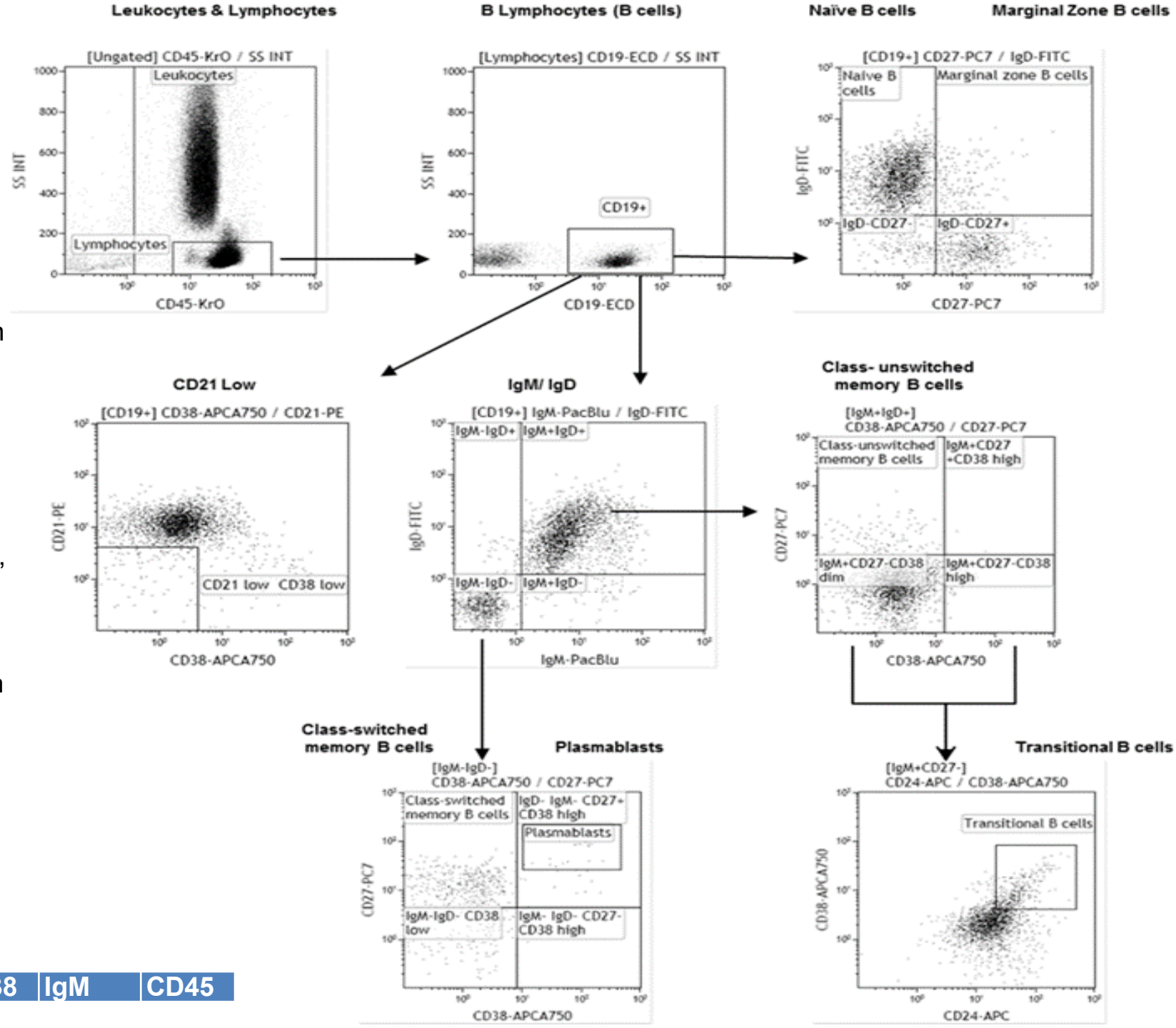


CD3

HLADr

# The DuraClone IM B cells Tube

The major function of B cells (CD45+CD19+) in the human immune system is to recognize and memorize immunogenic structures and to terminally differentiate into plasma cells that produce antibodies against these recognized or memorized antigens. Late maturation stages of B cells are confined to peripheral compartments and can be described based on a previously published classification. The passage from bone marrow into peripheral compartments is associated with surface expression of immunoglobulin of the isotype classes M and D (IgM, IgD). Among IgM+ B cells high expression of CD24 along with absence of CD27 identifies transitional B cells, the earliest stage of maturation in peripheral compartments. Acquisition of CD27 expression identifies transition from a naïve to a marginal zone phenotype, further acquisition of low CD38 expression reveals memory identity (non-isotype -class-switched). Loss of IgM and IgD surface expression is indicative of immunoglobulin isotype class switching giving rise to CD27+CD38- class-switched memory cells or CD27+CD38++ plasmablasts.



IgD   CD21   CD19   CD27   CD24   CD38   IgM   CD45

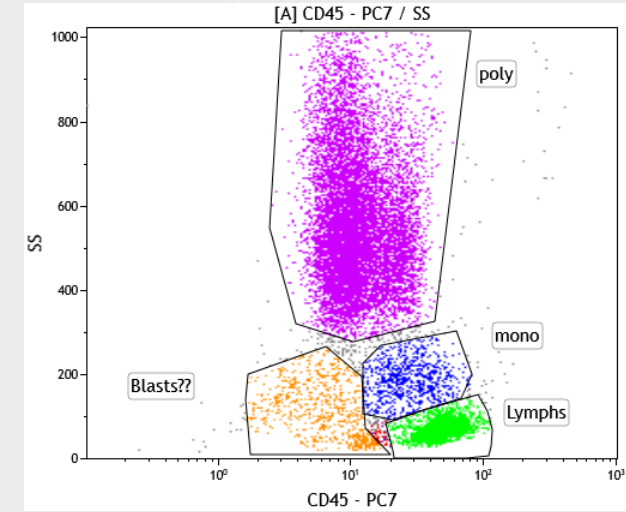


# ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

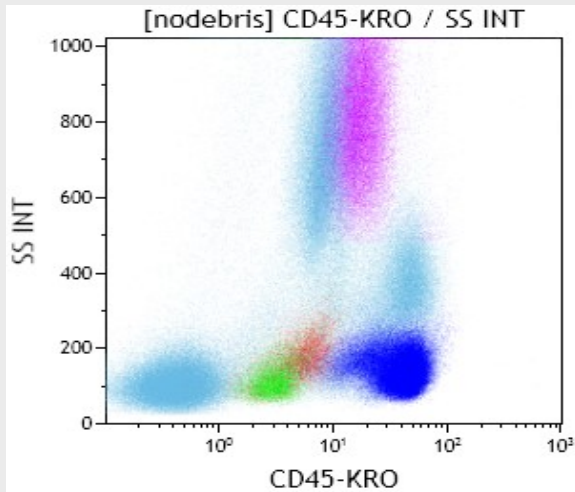
## Δ) ΟΞΕΙΑ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

# Η κυτταρομετρία ροής στην οξεία λευχαιμία (ΟΛ)

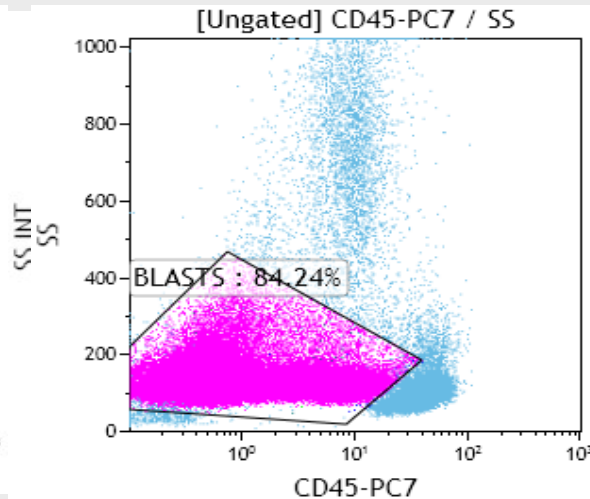
- Προσδιορισμός βλαστών SS/CD45, κύτταρα με ασθενή έκφραση CD45, οριοθέτηση και ποσοστό
- Τυποποίηση : τι δείκτες εκφράζουν? Ποιας σειράς? (μυελικής, λεμφικής, ερυθράς, μεγακαρυωτικής?)
- Έλεγχος δεικτών ωρίμανσης, επιφάνεια και κυτταροπλασματικά
- Ταξινόμηση ΟΛ (FAB, EGIL, WHO)
- Πρόγνωση ?



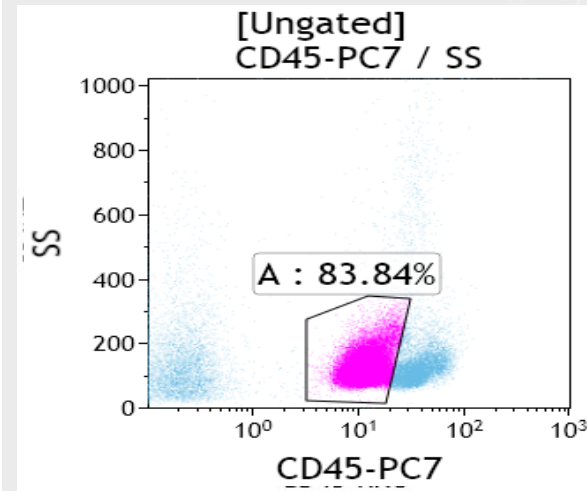
# Αναγνώριση παθολογικού βλαστικού πληθυσμού



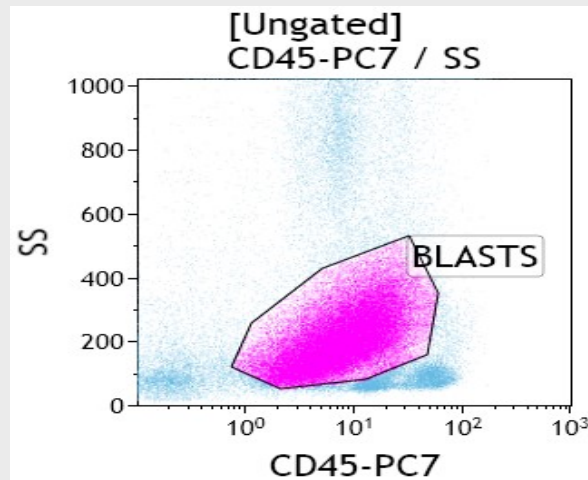
Φυσιολογικός Μυελός των Οστών



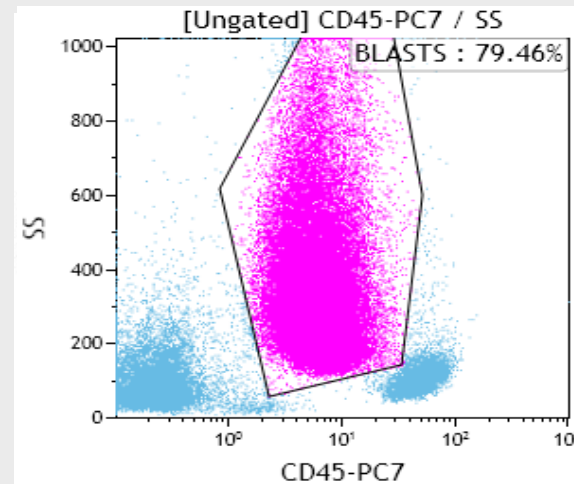
Συνήθης θέση Β ΟΜΛ



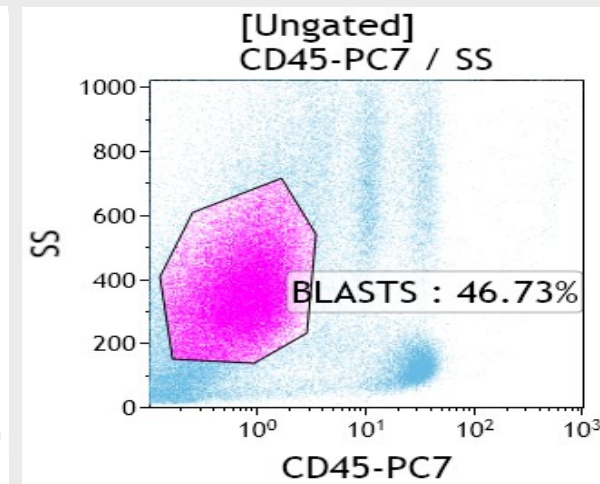
Συνήθης θέση Τ ΟΜΛ



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

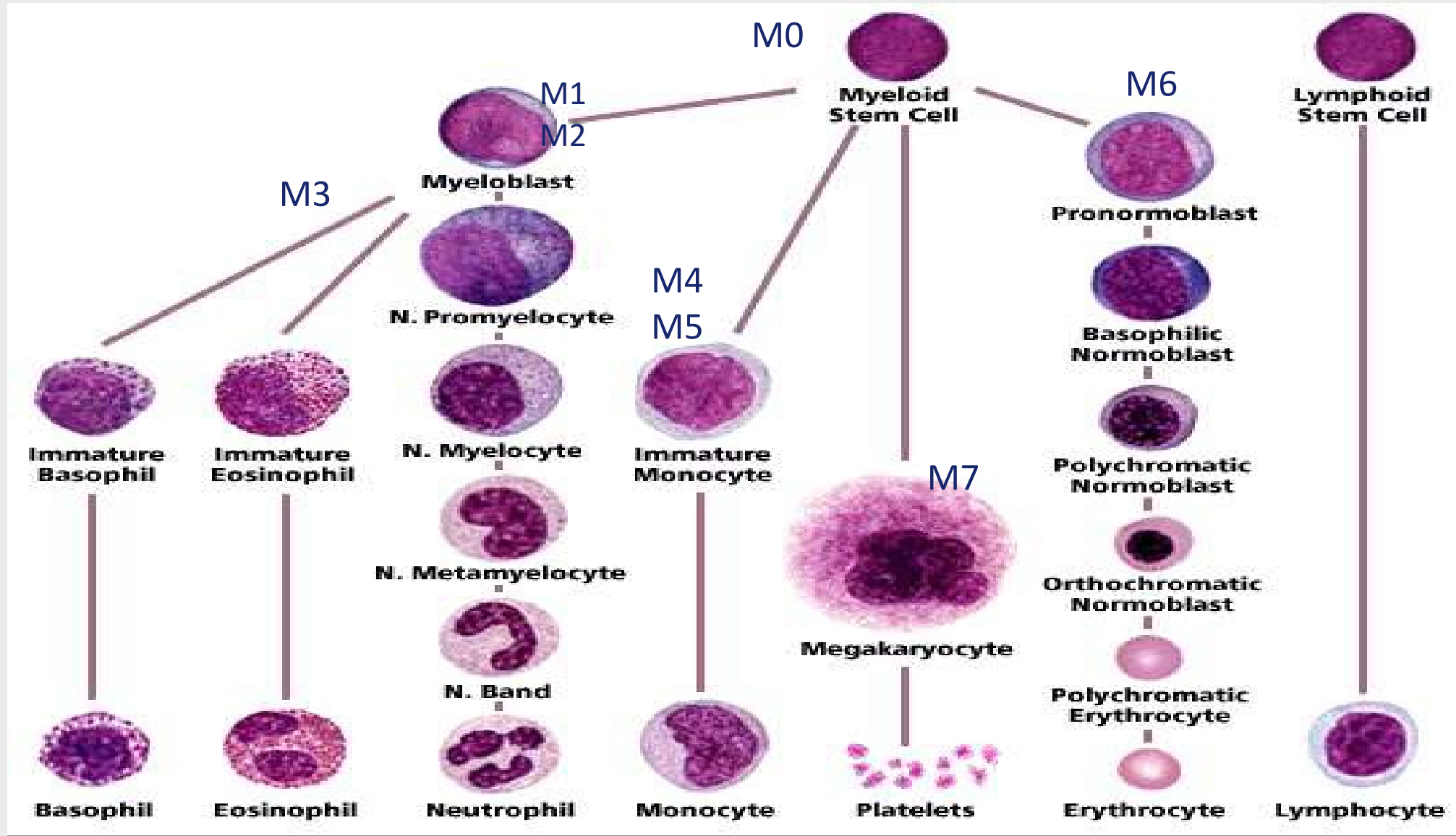
Κατά FAB

Συνήθης Ανοσοφαινότυπος

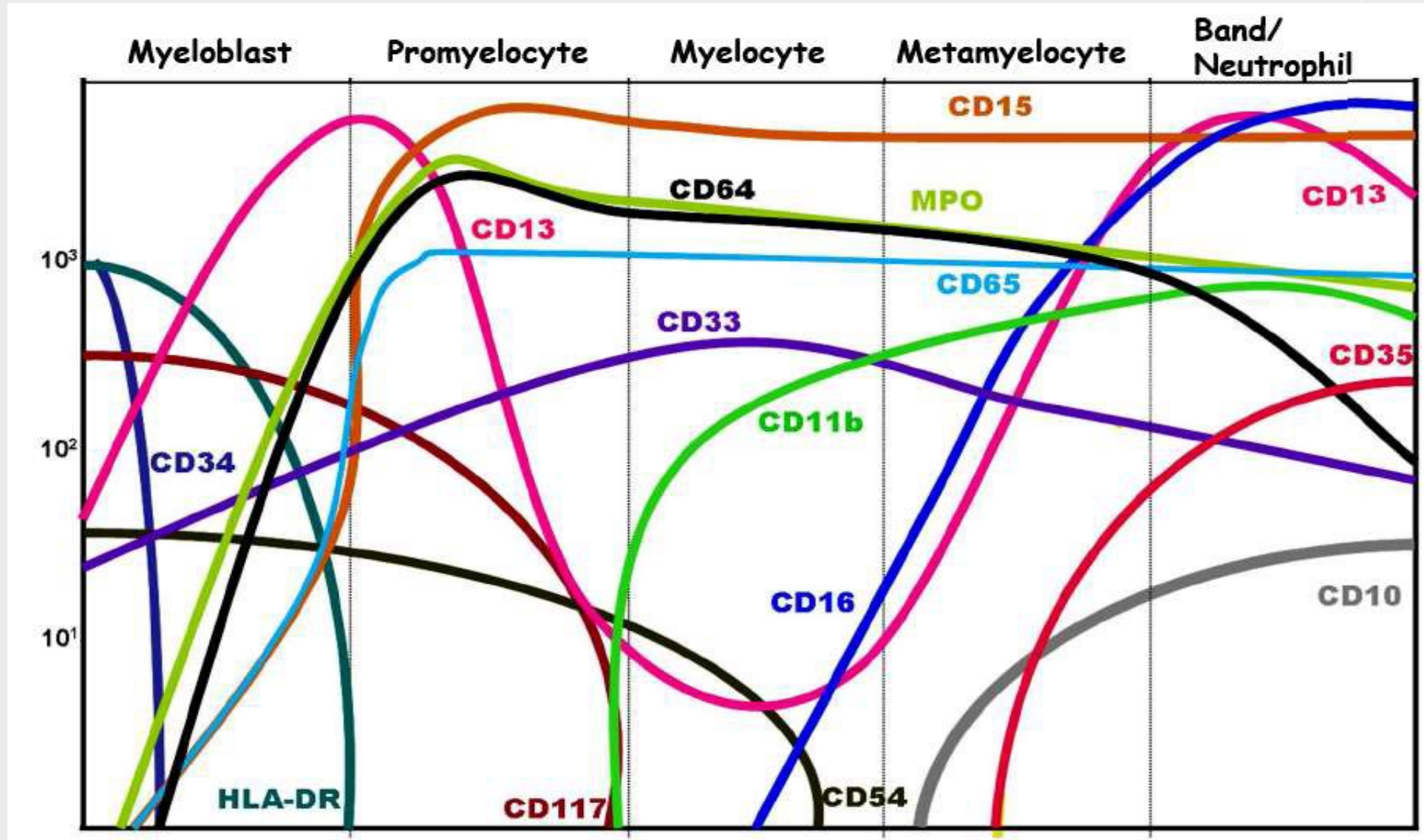
M0	ΟΜΛ με ελάχιστη διαφοροποίηση	MPO- CD34+ CD133+ CD13+ CD33+ HLADR+
M1	ΟΜΛ χωρίς ωρίμανση	MPO+ CD34+/- CD117+ CD13+ CD33+
M2	ΟΜΛ με ωρίμανση	MPO+ CD34+/- CD117+/- CD13+ CD33+ CD15+ CD11b+
M3	Προμυελοκυτταρική Λευχαιμία	MPO+++ CD33+++ HLADR- CD34- CD15- CD11b- (CD2+ σε variant μικροκοκκιώδη μορφή)
M4	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

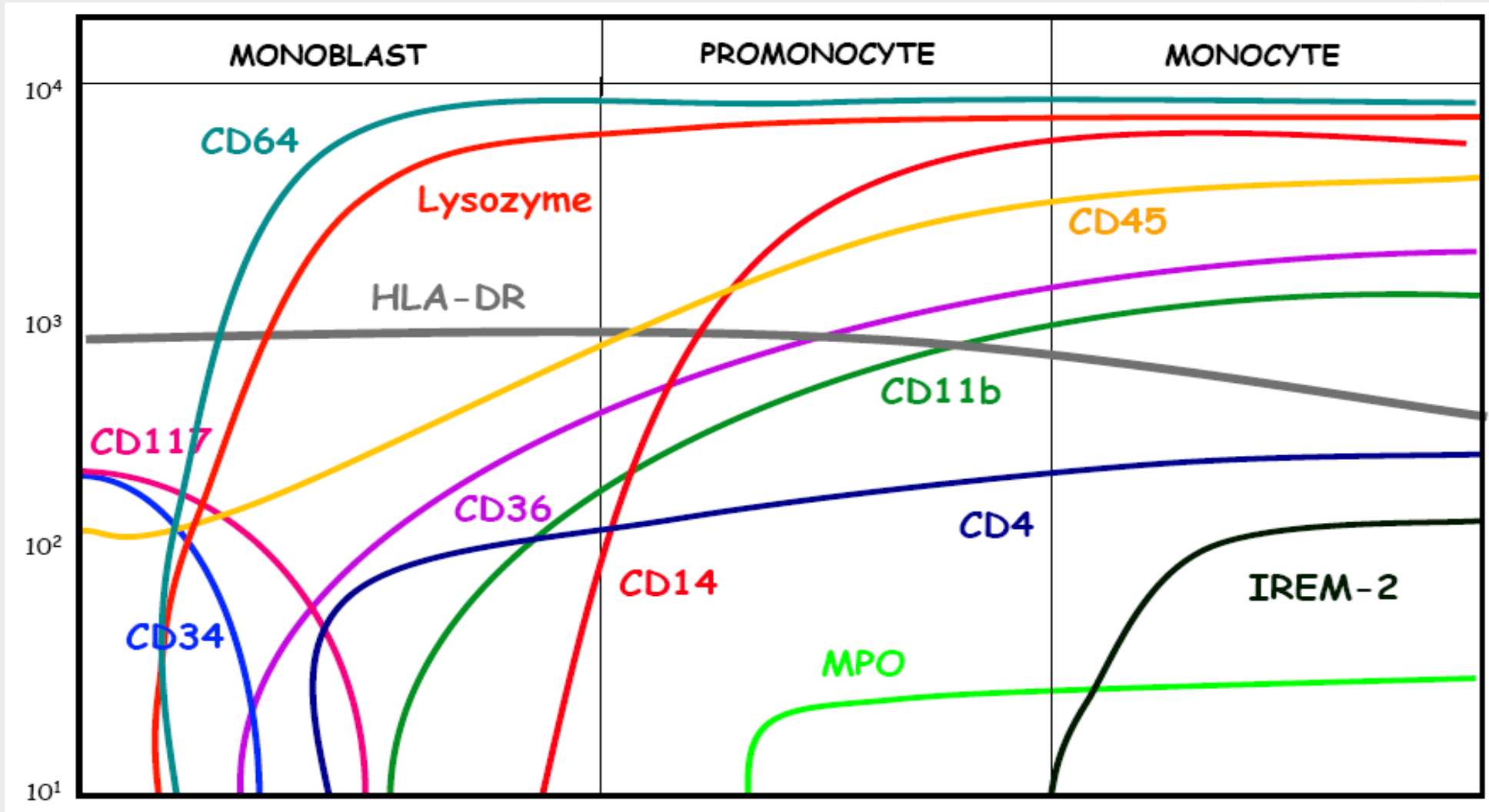


# Δείκτες κατά την φυσιολογική διαφοροποίηση της μυελικής σειράς



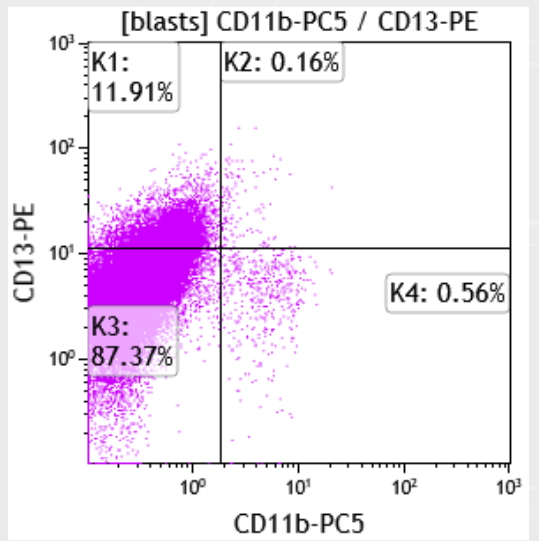
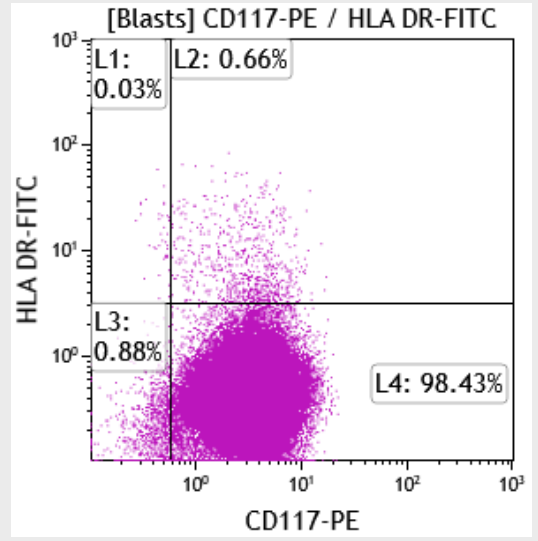
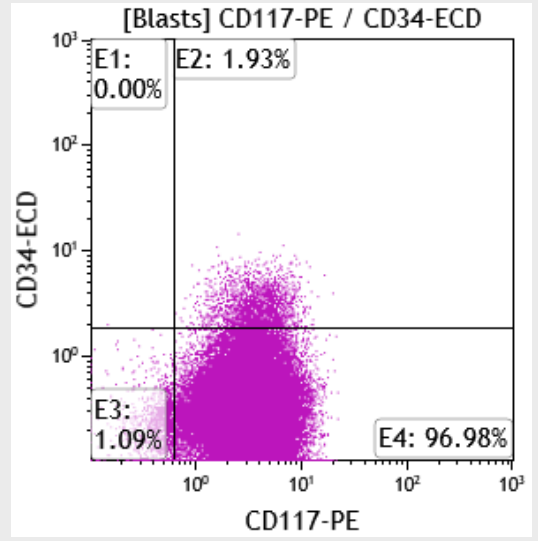
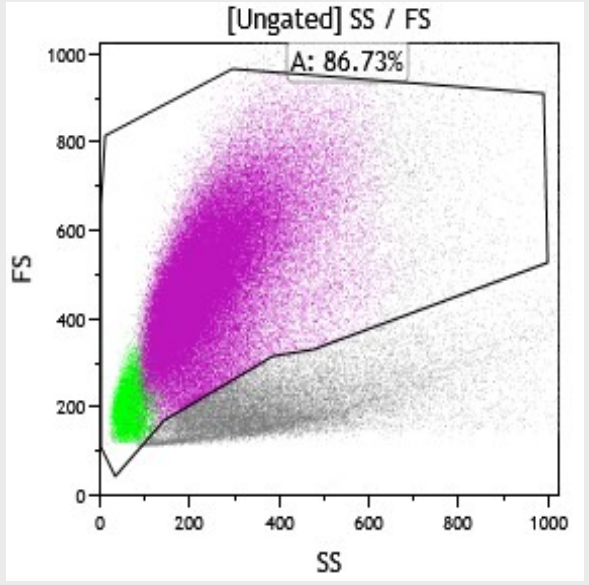
Καθορισμός Βαθμού Ωρίμανσης

## Δείκτες κατά την φυσιολογική διαφοροποίηση της μονοκυτταρικής σειράς

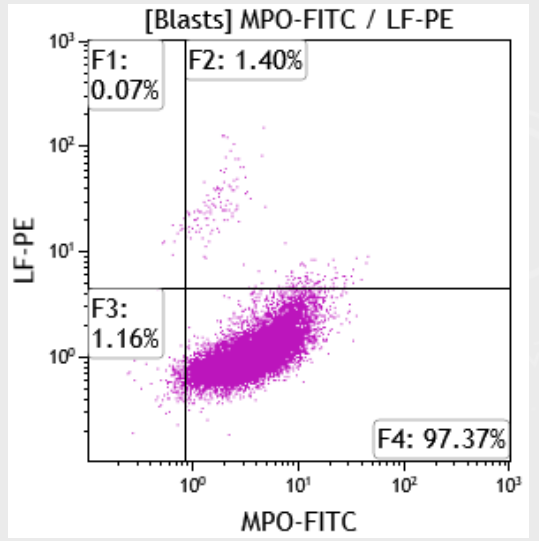
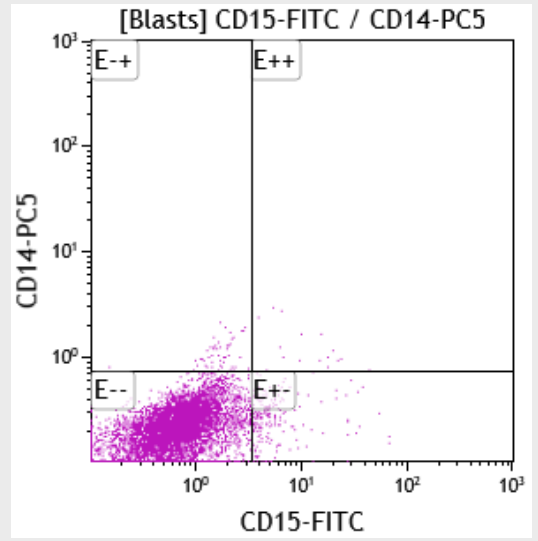
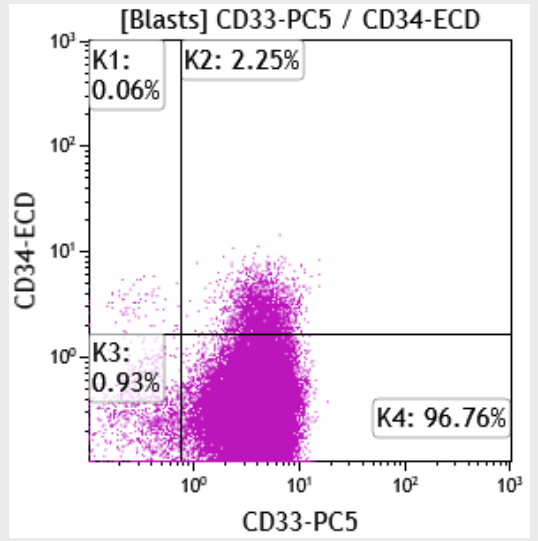
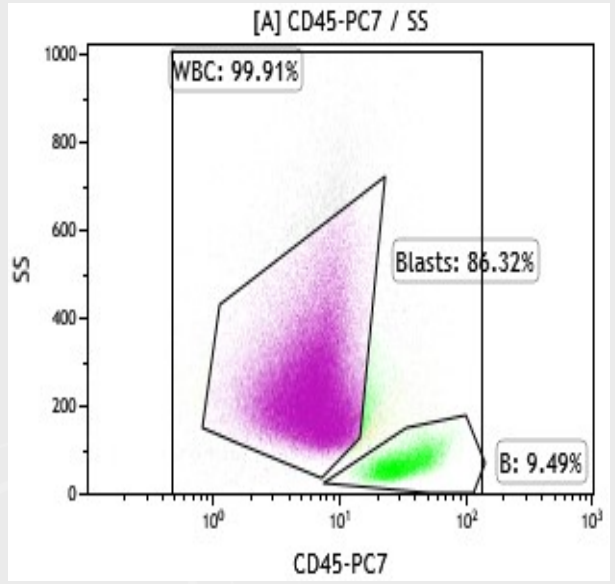


Μονοβλάστες : CD64+ CD36+ CD11b+ CD4+ CD14 - IREM2 - MPO -  
 Προμονοκύτταρα : CD64++ CD36+ CD11b+ CD4+ CD14 + IREM2 - MPO dim  
 Μονοκύτταρα : CD64++ CD36+ CD11b+ CD4+ CD14 + IREM2 + MPO dim

# 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 ή 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+

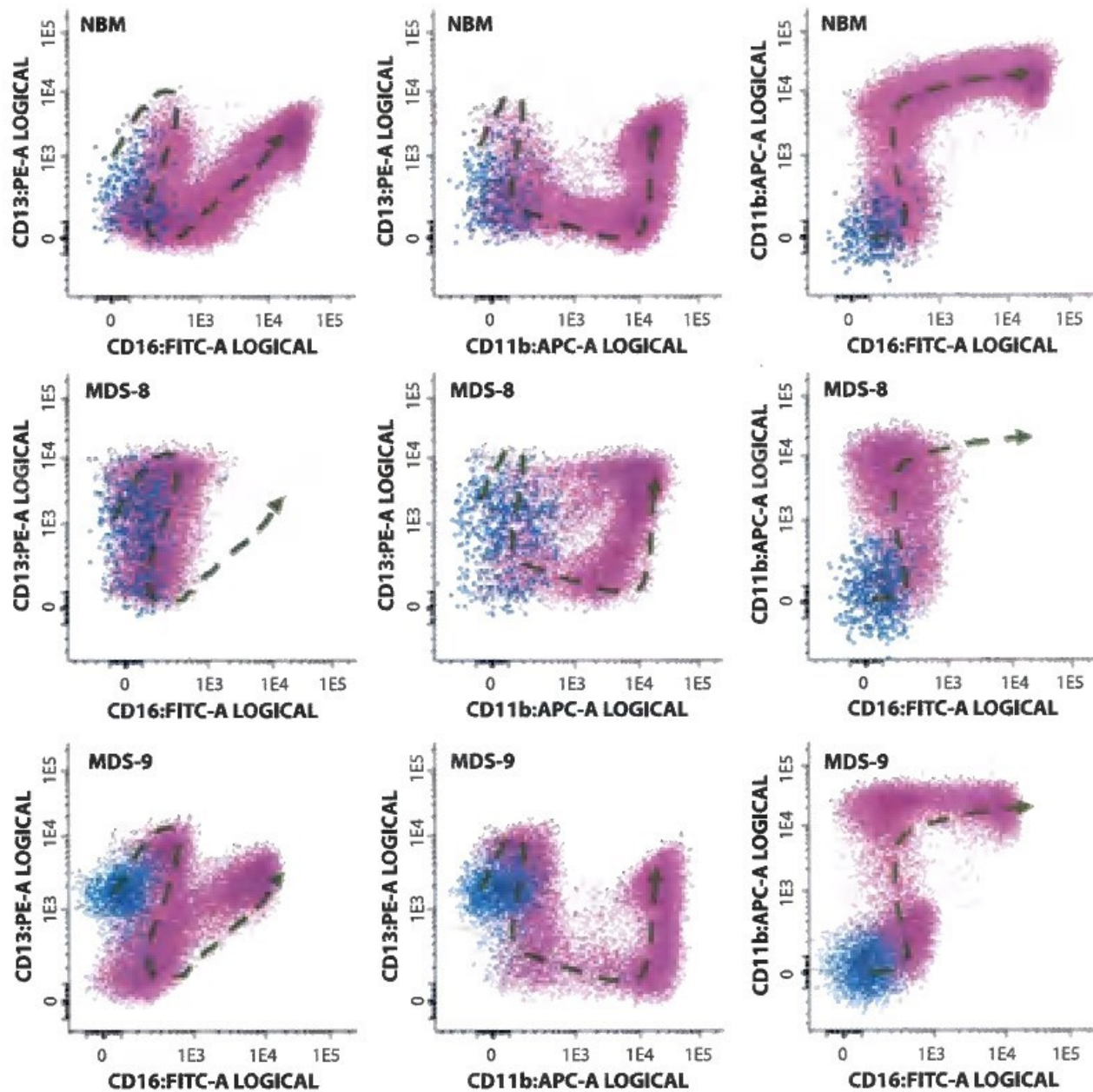




# ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

## Ε) ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΙΕΣ

# ΜΔΣ, patterns



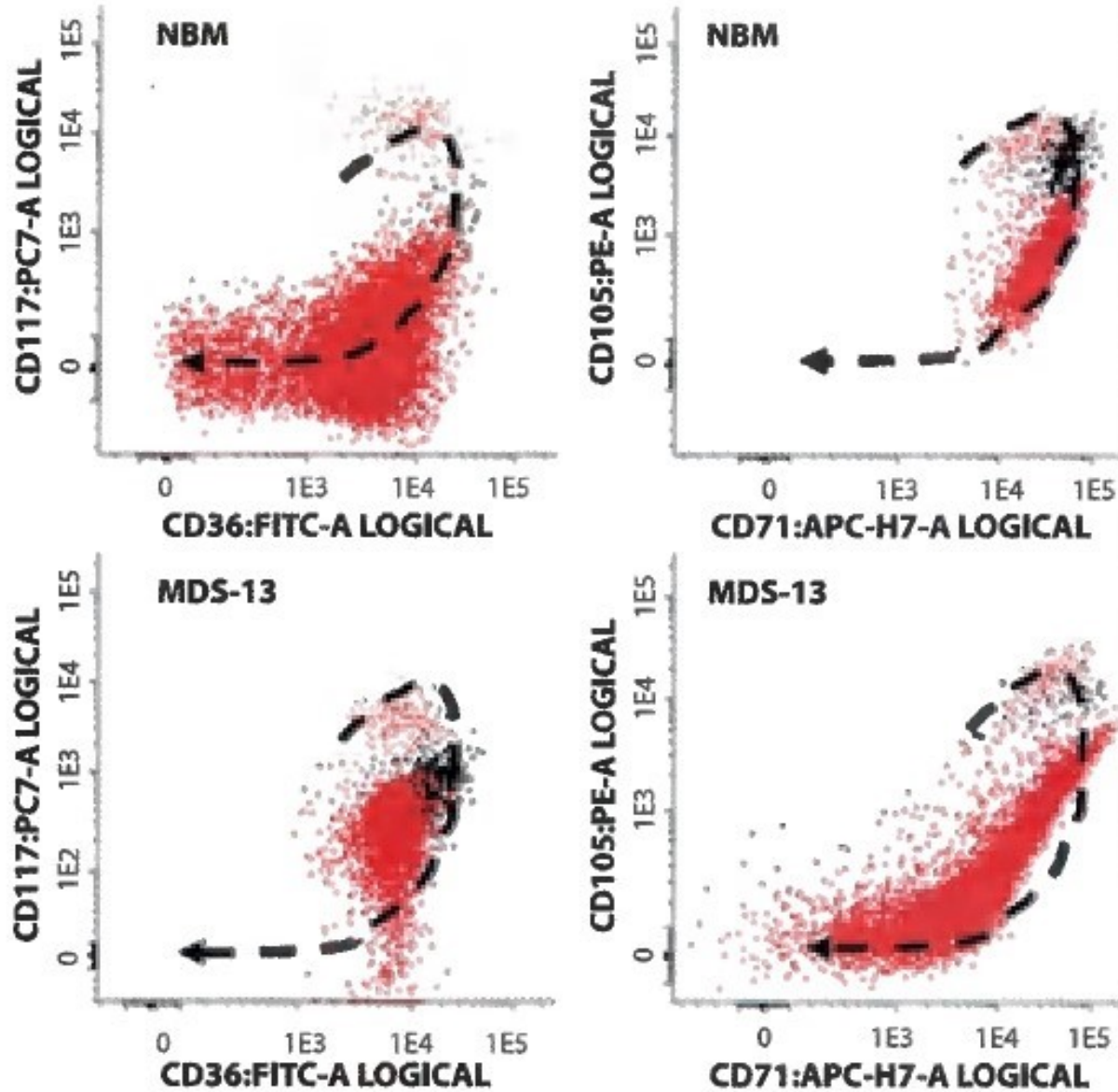
## ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΜΥΕΛΟΣ

ΜΔΣ 1

ΜΔΣ 2

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

## 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)  $\geq 2$  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

**Βασικοί 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

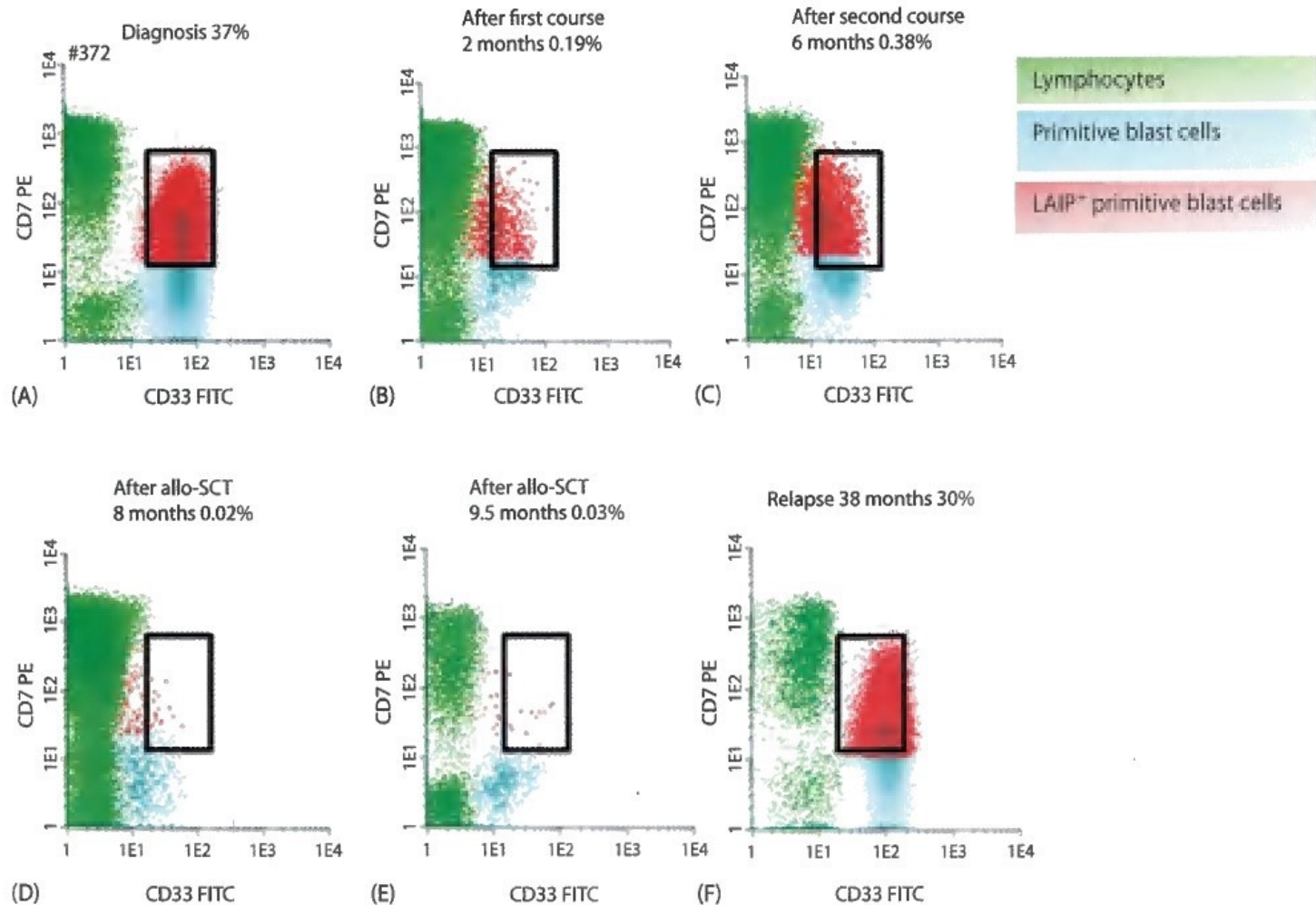
Πολλαπλούν  
Μυέλωμα

Στρατηγική (συχνά εξειδικευμένη)

Μεταμόσχευση  
Μυελού

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

# Ελάχιστη Υπολειπόμενη Νόσος (ΕΥΝ)



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

The Figure shows a CD34<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> 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 (EYN)

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 EYN με KP  
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**



# ΛΗΨΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ



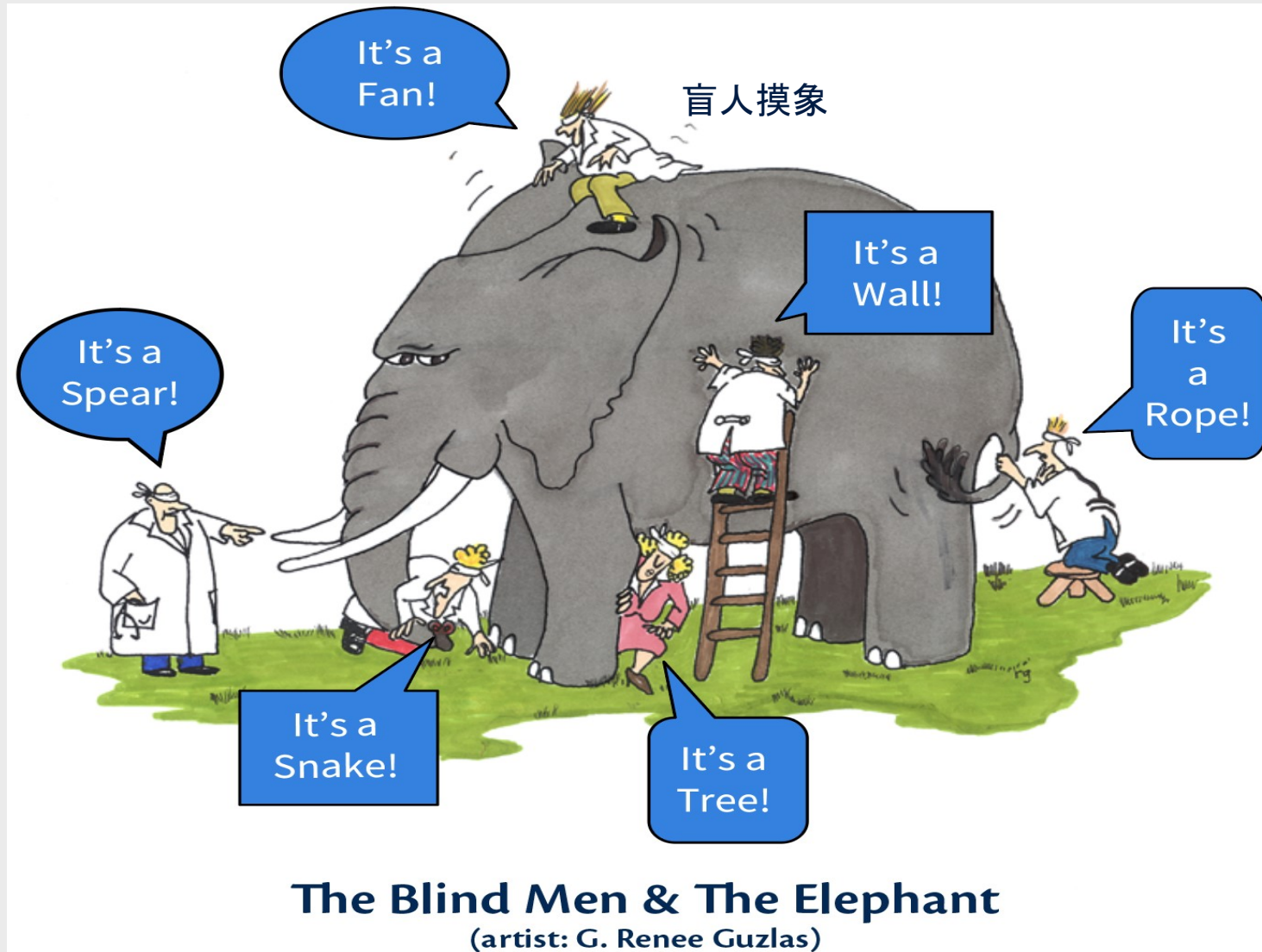
# ΛΗΨΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

- 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, Infimicyt κλπ)

Στο μέλλον  
(παρόν στην έρευνα)



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

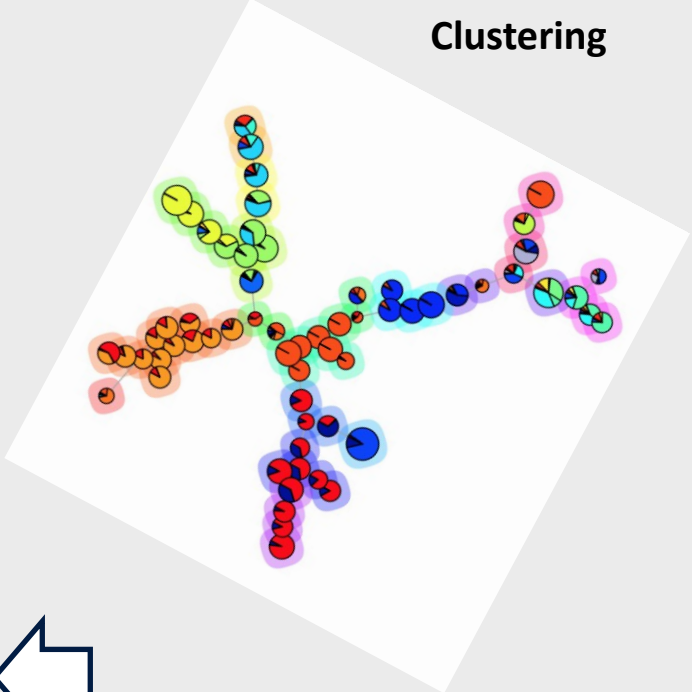
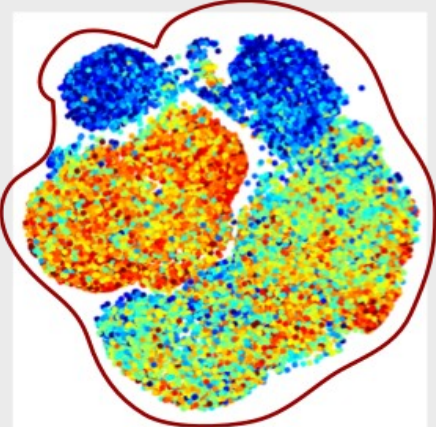
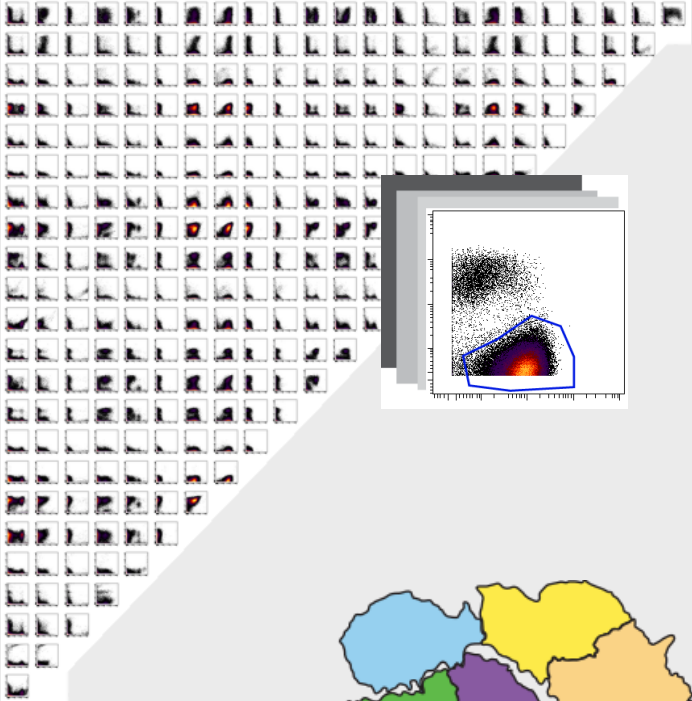
# ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ «MACHINE LEARNING" ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ

Raw Data Processing,  
Quality Control

Dimensionality  
Reduction

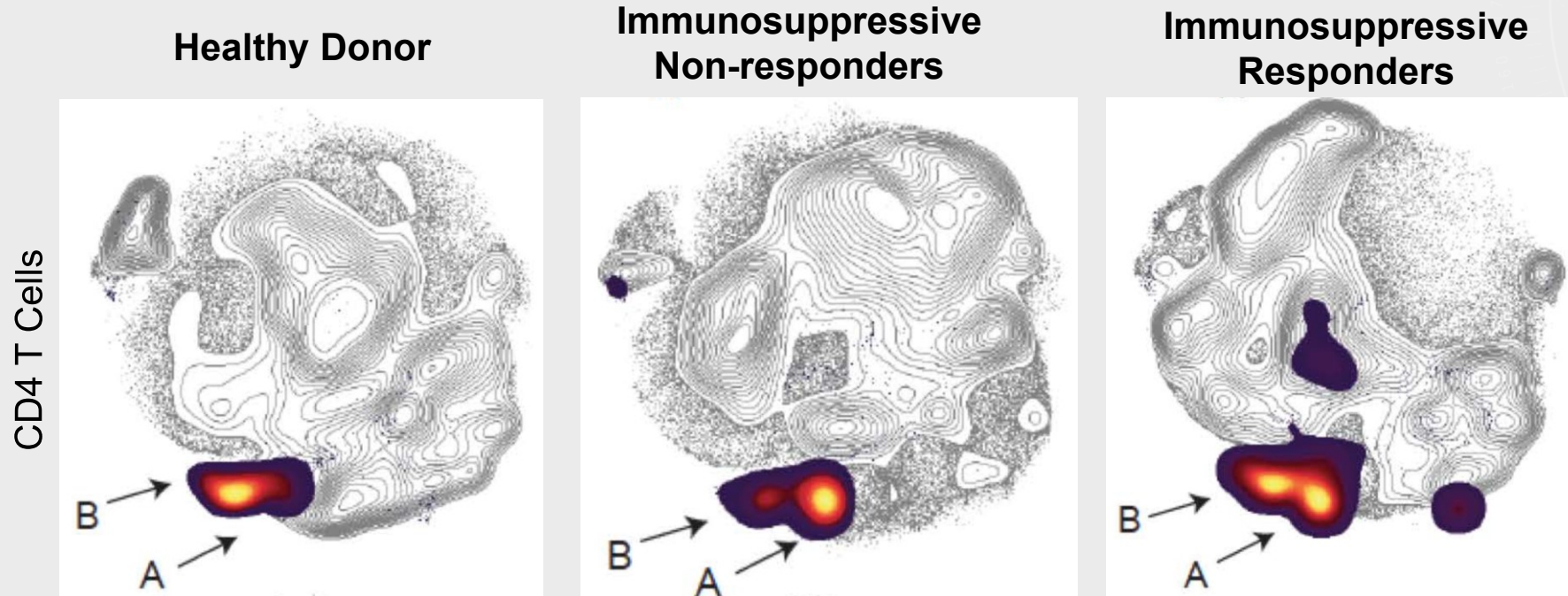
Clustering

Data Visualization



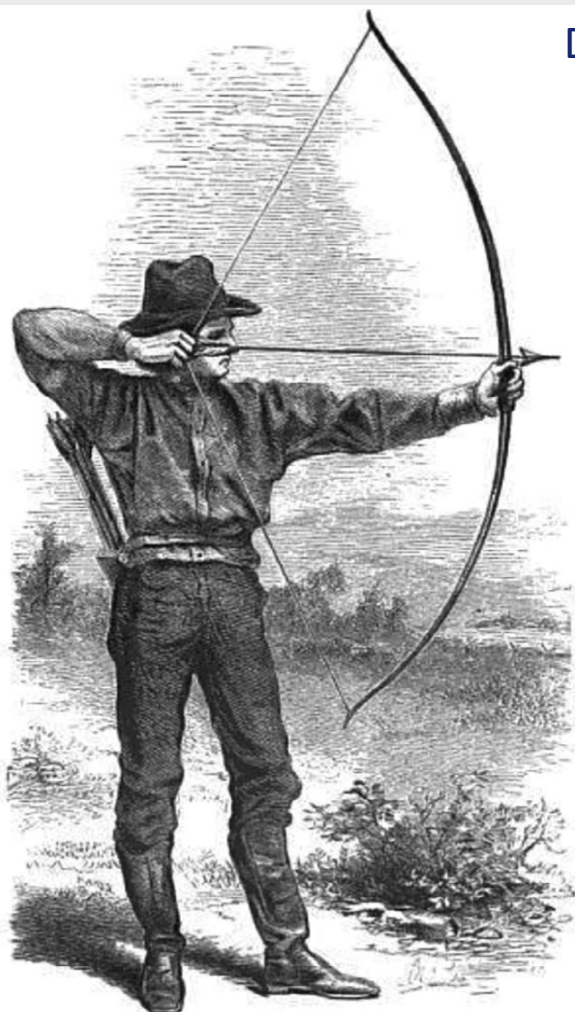
	CD3	CD4	CD8a	CD69	CD45RA
Naïve CD4 <sup>+</sup> T cells	Yellow	Yellow	Black	Black	Yellow
Memory CD4 <sup>+</sup> T cells	Yellow	Yellow	Black	Black	Black
Naïve CD8 <sup>+</sup> T cells	Yellow	Black	Yellow	Yellow	Yellow
Memory CD8 <sup>+</sup> T cells	Yellow	Black	Yellow	Black	Black

# 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



**DRAWING THE BOW.**

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.)

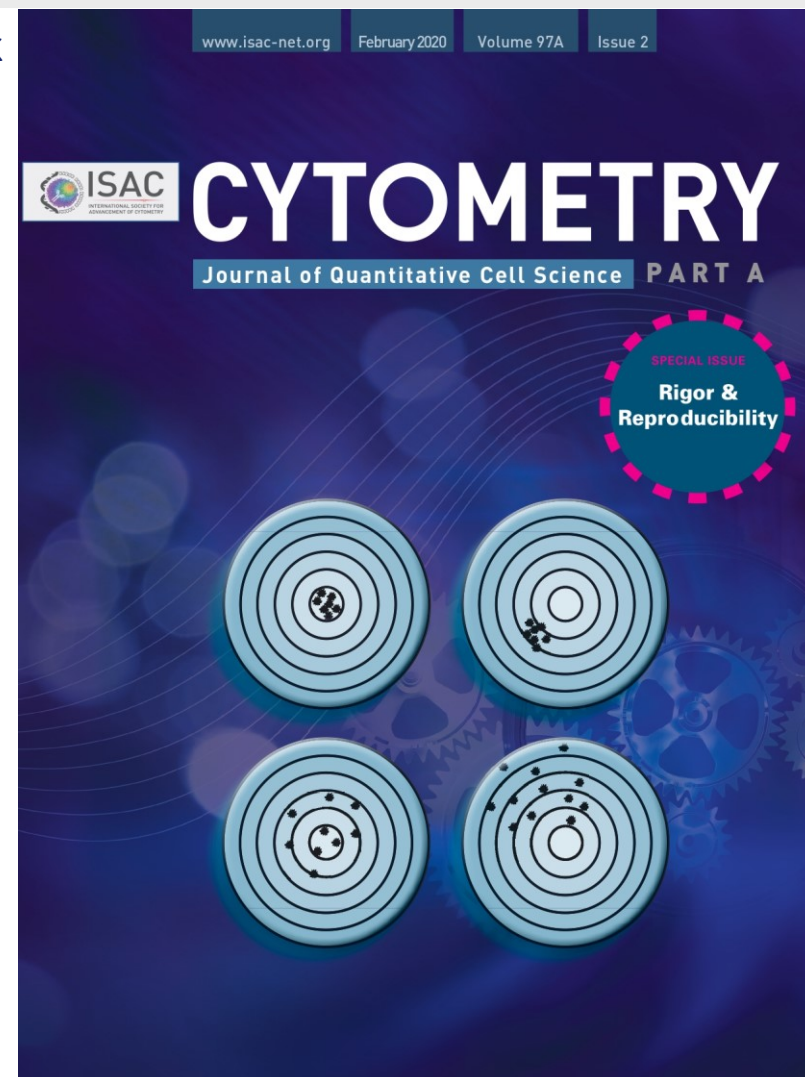
## Drawing the Bow for Reproducibility, Attila Tárnok

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



## Η Κυτταρομετρία Ροής στην βιοϊατρική έρευνα

- Κατανόηση κυτταρικών λειτουργιών και αλληλεπιδράσεων (Φυσιολογία)
- Προσδιορισμός μηχανισμών με θεραπευτική αξία (πχ σημεία ελέγχου αναστολέων)
- Ανακάλυψη βιοδεικτών (πχ πρόβλεψη στην θεραπευτική απόκριση)
- Λειτουργικές διαδικασίες (πχ πολλαπλασιασμός, έκκριση κυτταροκινών)
- Χαρακτηρισμός σωματιδίων σε δείγμα (πχ μέγεθος, φορτίο, δείκτες επιφανείας)

# 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
- Αποτελεί προϋπόθεση για εξειδικευμένο κυτταροδιαχωρισμό
- Πολυπαραμετρική, (πολυδιάστατη) το σύνολο της πληροφορίας βασίζεται στο συνδυασμό πολλών διαστάσεων





## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[HTTPS://WWW.BECKMAN.COM/RESOURCES/VIDEOS?\\_GA=2.88674717.723689362.1632904189-1007924286.1629697900](https://www.beckman.com/resources/videos?_ga=2.88674717.723689362.1632904189-1007924286.1629697900)

[HTTPS://WWW.BDBIOSCIENCES.COM/EN-EU/LEARN/TRAINING](https://www.bdbiosciences.com/en-eu/learn/training)

[HTTPS://WWW.10XGENOMICS.COM/PRODUCTS/MULTIOMIC-CYTOMETRY](https://www.10xgenomics.com/products/multiomic-cytometry)

[FLOW CYTOMETRY EDUCATIONAL VIDEOS & WEBINARS | THERMO FISHER SCIENTIFIC – GR](#)

[HTTPS://WWW.CELLSIGNAL.COM/APPLICATIONS/FLOW-CYTOMETRY/FLOW-CYTOMETRY-OVERVIEW](https://www.cellsignal.com/applications/flow-cytometry/flow-cytometry-overview)

## 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

Ευάγγελο Γιαμαρέλλο, Δ' Παθολογική Κλινική, Αττικό

Λίλα Δημητρακοπούλου, Ανοσολογικό Εργαστήριο, Λαϊκό

Γεώργιο Πατεράκη, Ανοσολογικό Εργαστήριο Γ. Γεννηματάς

Μαριάννα Τζανουδάκη, Ανοσολογικό Εργαστήριο Αγ Σοφία

