

# Imunofenotipizacija krvnih stanica u KLL-u



**dr. sc. Barbara Vuković, spec. med. biokemije i lab. medicine**

Specijalistički medicinsko-biokemijski laboratorij, Poliklinika Retfala, Osijek  
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Osijek

# KLL/SLL imunofenotip

► Tipični imunofenotip zrelih B-limfocita u KLL-u:

1. pojava biljega jedne stanične loze na drugoj (**abercija**):

T-limfocitni biljeg CD5 na površini B-limfocita

2. **promjena intenziteta** fluorescencije očekivanog (tipičnog) biljega loze

B-limfocitni biljeg **CD20 + slg** niži izražaj na površini B-limfocita (engl. *dim*)

3. dokaz **klonalnosti** patološke stanične populacije

- restrikcija površinskih lakih lanaca imunoglobulina (kappa vs. lambda)

- ↑ ili ↓ omjer lakih lanaca (RI  $\kappa / \lambda$ : 0,26-1,65)

- Pozitivni pan B-biljezi: **CD19, CD20, CD22**

- **CD23+, CD200+** (FMC7- - diff dg za B-NHL)

# Protočna citometrija – moćna metoda za dijagnostiku hematoloških bolesti

- Lab. dijagnostika hematoloških maligniteta ima 3 osnovne uloge:
  1. utvrđivanje dijagnoze
  2. prognostička klasifikacija
  3. procjena učinkovitosti terapije
- **imunofenotipizacija protočnom citometrijom** (engl. *flow cytometry immunophenotyping*, FCI) - mogućnost ispunjavanje sve tri navedene uloge !
- velika brzina, široka primjena u dijagnostici i praćenju, jasno označavanje maligne populacije (ciljani površinski i unutarstanični biljezi)
- **PROBLEMI:**
- metoda jako ovisna o ekspertizi korisnika (tehnoškoj i kliničkoj)
- porast broja antitijela i fluorokroma na tržištu - standardizacija lab. procesa i dizajna dg panela biljega – brojni pokušaji !
- nagli razvoj sve složenijih citometara i softvera – harmonizacija analize podataka i interpretacije rezultata ??

# KLL vs. ostali B-NHL – imunofenotipski diff dg

- Matutes score bodovni sustav

Biljeg	Bodovi	
	1	0
CD5	poz	neg
CD23	poz	neg
FMC7	neg	poz
slg (κ ili λ)	poz (slab izražaj)	poz (srednji do visoki izražaj)
CD22 ili CD79b	poz (slab izražaj)	poz (srednji do visoki izražaj)

- KLL: > 4 boda, limfomi: 0-3 boda
- Nedovoljna reproducibilnost (atipični KLL ?)
- Pojava novih biljega – odabir biljega u dijagnostičkim algoritmima ?
- Inicijativa ERIC / ESCCA (European Research Initiative on CLL / European Society for Clinical Cell Analysis), 2017.g. - konsenzus za reproducibilnu dijagnostiku KLL-a pomoću PC:
  - A) OBAVEZNI BILJEZI: CD5, CD19, CD20 (slab), CD23, slgκ/slgl (slab)
  - B) PREPORUČENI BILJEZI: CD10, CD43, CD200, CD79b, ROR1, CD81
  - C) NEESENCIJALNI: FMC7, CD22, CD45, CD38

# Flow MRD u KLL-u

- **iwCLL/ERIC** - nedetektabilni MRD - prisutnost < 1 KLL stanice na 10 000 leukocita
- Razvoj protočne citometrije i zahtjeva za MRD KLL panele zadnjih 20 godina - povećanje broja biljega/boja i smanjenje broja epruveta - povećanje osjetljivosti i potreba za manjim brojem skupljenih stanica + skraćivanja vremena analize

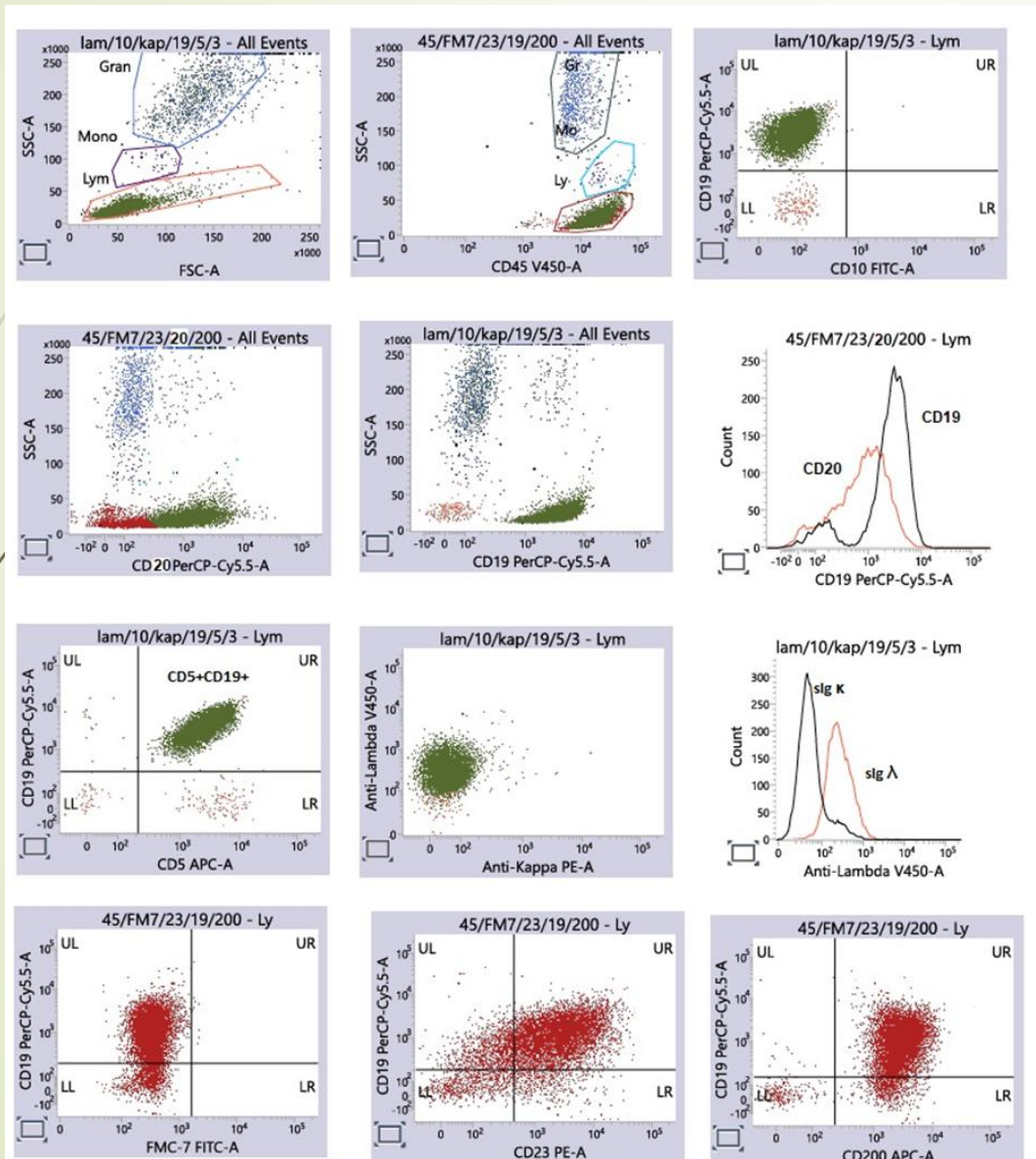
Protočna citometrija – kombinacija MRD panela biljega	4 boje – 4/5 epruveta 2007.g.	6 boja – 2 epruvete 2013.g.	6/8 boja – 1 epruveta 2016.g.
<b>Osjetljivost</b>	<b>MRD4</b>	<b>MRD5</b>	<b>MRD5</b>
<b>Potreban broj stanica za MRD4 / potrebno vrijeme akvizicije</b>	5 milijuna/epruveta / 20 minuta/epruveta	2 milijuna/epruveta / 8 minuta/epruveta	1 milijun/epruveta / 4 minute/epruveta
<b>Potreban broj stanica za MRD5</b>	>40 milijuna/epruveta / 3 h/epruveta	10 milijuna/epruveta / 40 minuta/epruveta	5 milijuna/epruveta / 18 minuta/epruveta
<b>Potrebno poznavanje početnog imunofenotipa</b>	ne	ne	Poželjno (manje osjetljiv na atipični CLL)

- **Prag 2026. EuroFlow** – 12 boja/1 epruveta – osjetljivost  $10^{-5}$ , neosjetljiv na vrstu terapije, neovisan o operateru, bez potrebe poznavanja početnog imunofenotipa – u validaciji



**A kako to izgleda u praksi...**

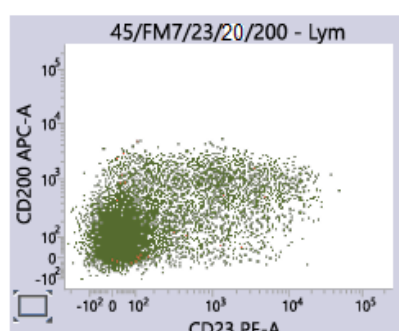
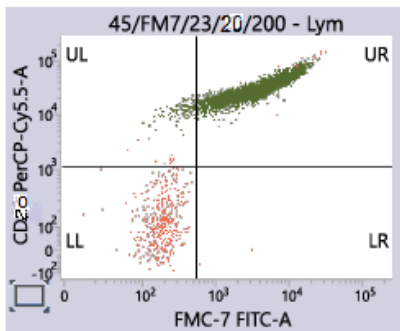
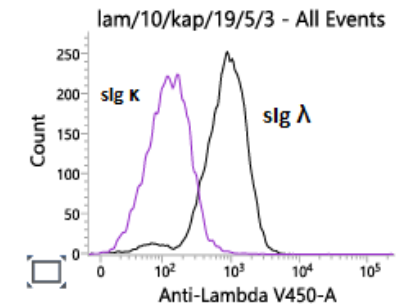
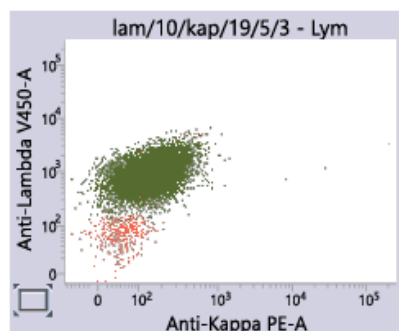
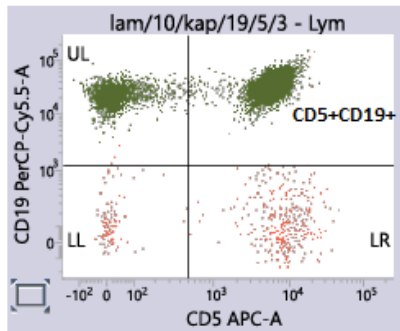
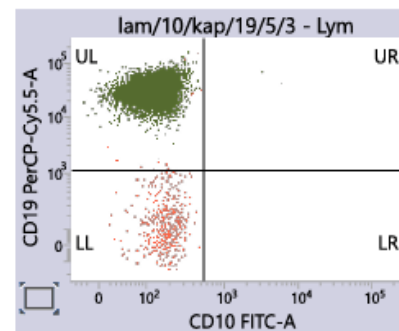
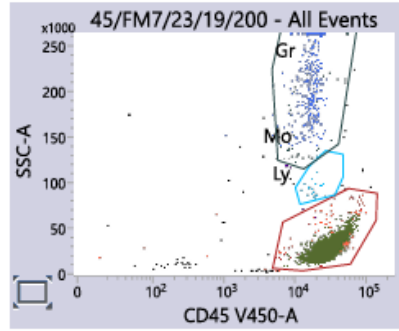
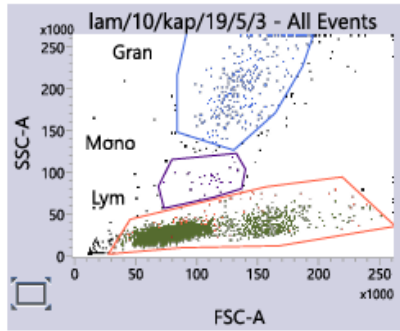
# Diferencijalna lab. dijagnostika perifernih B-limfocitnih neoplazmi s koekspresijom CD5+CD19+



**TIPIČNI KLL** - imunofenotipizacija limfocita periferne krvi.

B-limfociti izražavaju površinski imunofenotip: CD5+, CD19+, CD20+(slab), CD23+, CD200+, slgLambda (slabo). Biljeg FMC7 je negativan u tipičnom KLL-u.

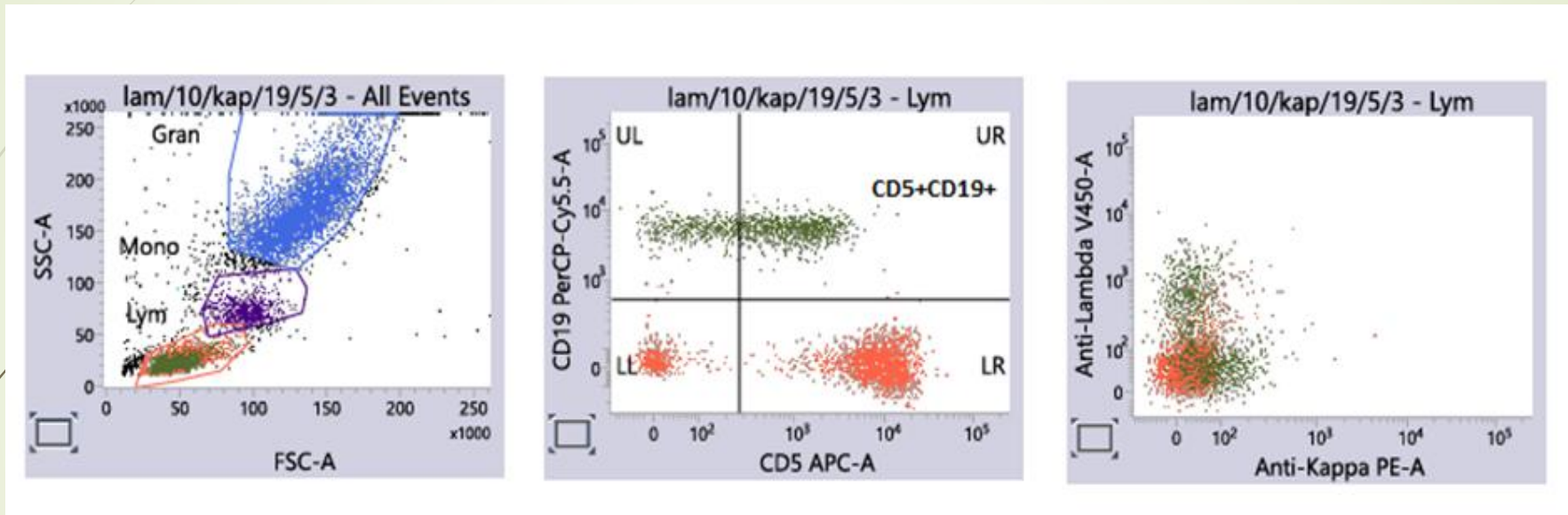
# Diferencijalna lab. dijagnostika perifernih B-limfocitnih neoplazmi s koekspresijom CD5+CD19+



## B-NHL-MCL (mantle)- imunofenotipizacija limfocita periferne krvi

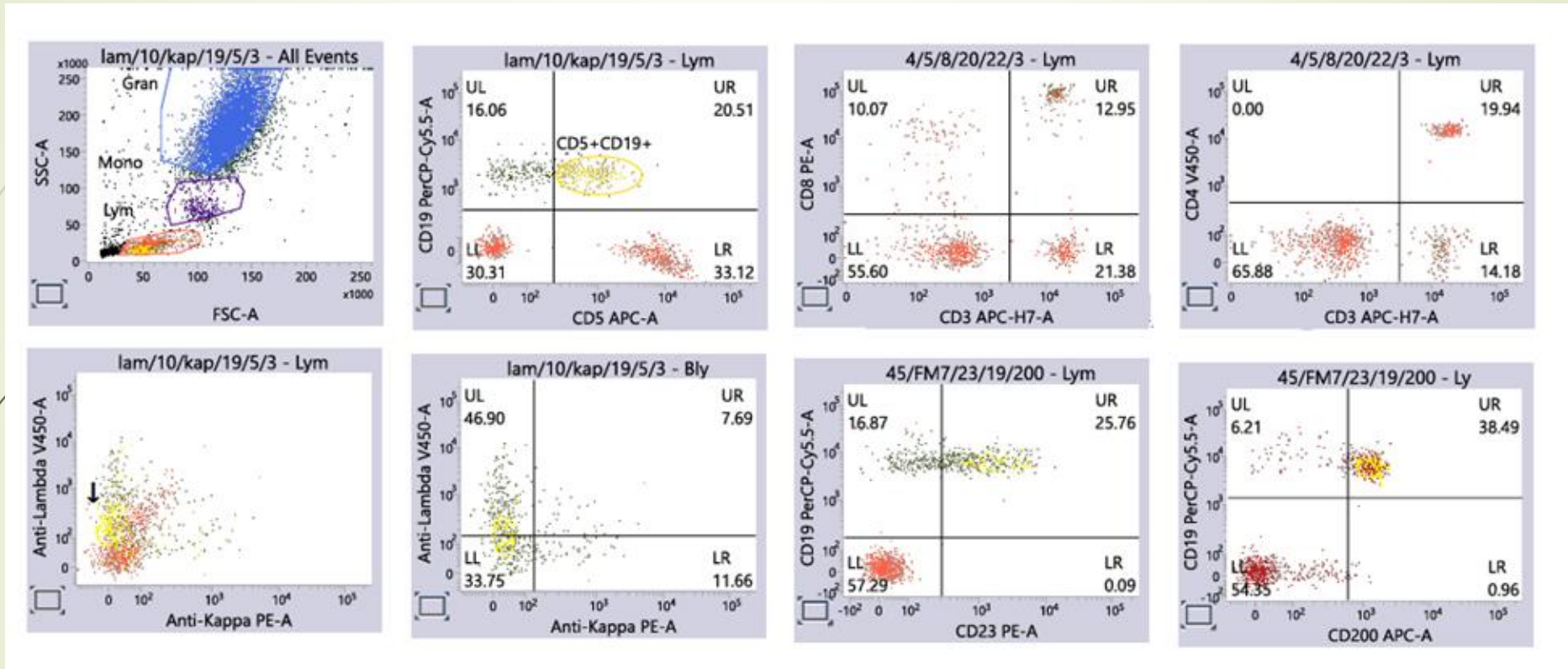
- monoklonalni B-limfociti KLL i za MCL - koekspresija biljega CD5+CD19+
- B-limfociti u limfomu imaju jači izražaj lakih lanaca imunoglobulina
- visoki izražaj biljega FMC7
- ne izražavaju biljege CD23 i CD200).

# Koekspresija biljega CD5+CD19+ u sklopu normalne imunološke reakcije – B1a-limfociti



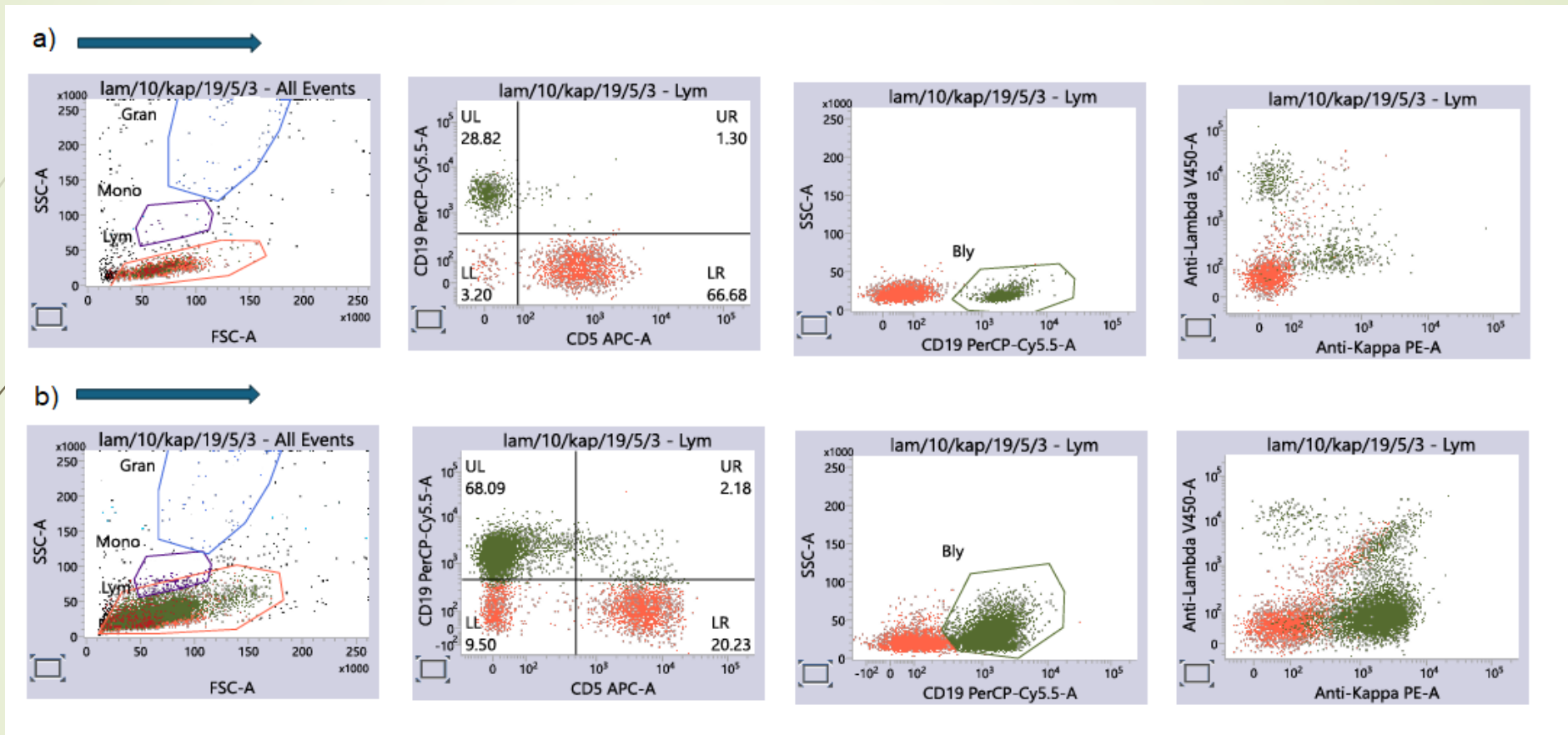
- Imunofenotipizacija limfocita u uzorku dječje krvi – nađeni su poliklonski B1a-limfociti (zeleno) koji koekspimiraju biljege CD5+CD19+ u sklopu normalne imunološke reakcije na vanjski antigen
- podvrsta B-limfocita uključenih u urođeni imunitet - biljeg sazrijevanja B-limfocita i stanja imunološkog sustava
- razina B1a-limfocita mijenja se s dobi
- više razine – DM tip 1, autoimune bolesti (npr. SLE, RA)

# Detekcija malog klona B-KLL-a unutar poliklonske populacije normalnih B-limfocita



- Immunofenotipizacija limfocita periferne krvi s umjerenom relativnom B-limfocitozom. Populaciju B-limfocita čini manji udio normalnih poliklonskih B-limfocita (zeleno) i nešto veći udio monoklonskih B-limfocita s B-KLL imunofenotipom CD5+, CD19+, CD23+, CD200+, sKappa+ (slab) (žuto).

# Klonalnost B-limfocita – poliklonski vs monoklonski B-limfociti

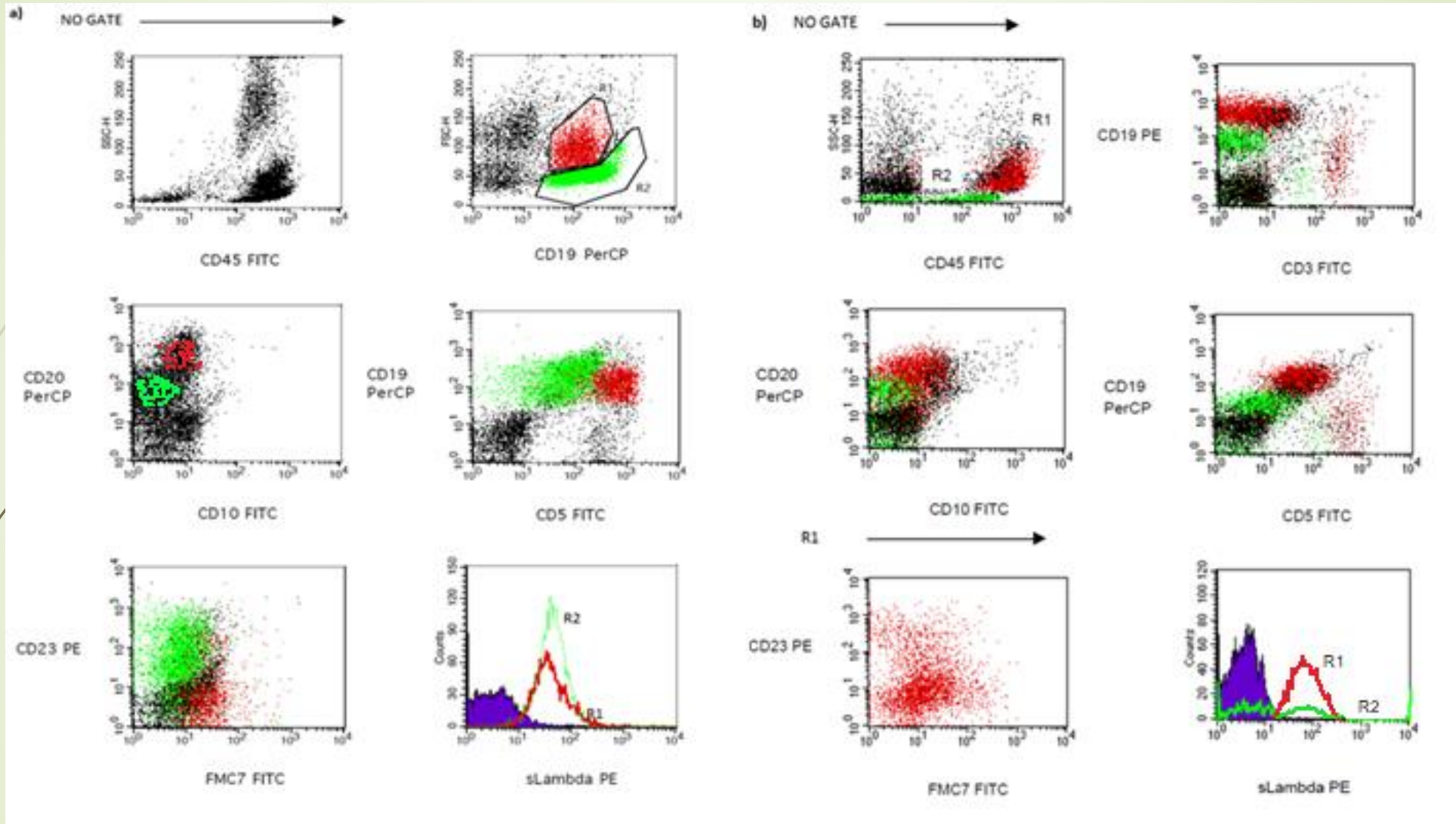


- Imunofenotipizacija stanica reaktivnog limfnog čvora (a) i stanica limfnog čvora u folikularnom B-NHL (b). U reaktivnom limfnom čvoru prisutni su normalni T-limfociti u otprilike dvostruko većem udjelu u odnosu na normalne poliklonske B-limfocite. U limfnom čvoru folikularnog B-staničnog limfoma prisutni su monoklonski kappa+ B-limfociti, čiji je udio više od dvostruko veći od udjela T-limfocita.

# Richterov sindrom

- transformacija KLL-a u limfom visokog gradusa
- javlja se u 2-10 % svih pacijenata s KLL-om
- normalno indolentni KLL transformira se u sekundarni difuzni limfom velikih B-limfocita (DLBCL)
- loša prognoza i kratko vrijeme preživljenja
- ključna brza dijagnostika !

# Richter sy – stadij transformacije u 2 hematopoetska odjeljka

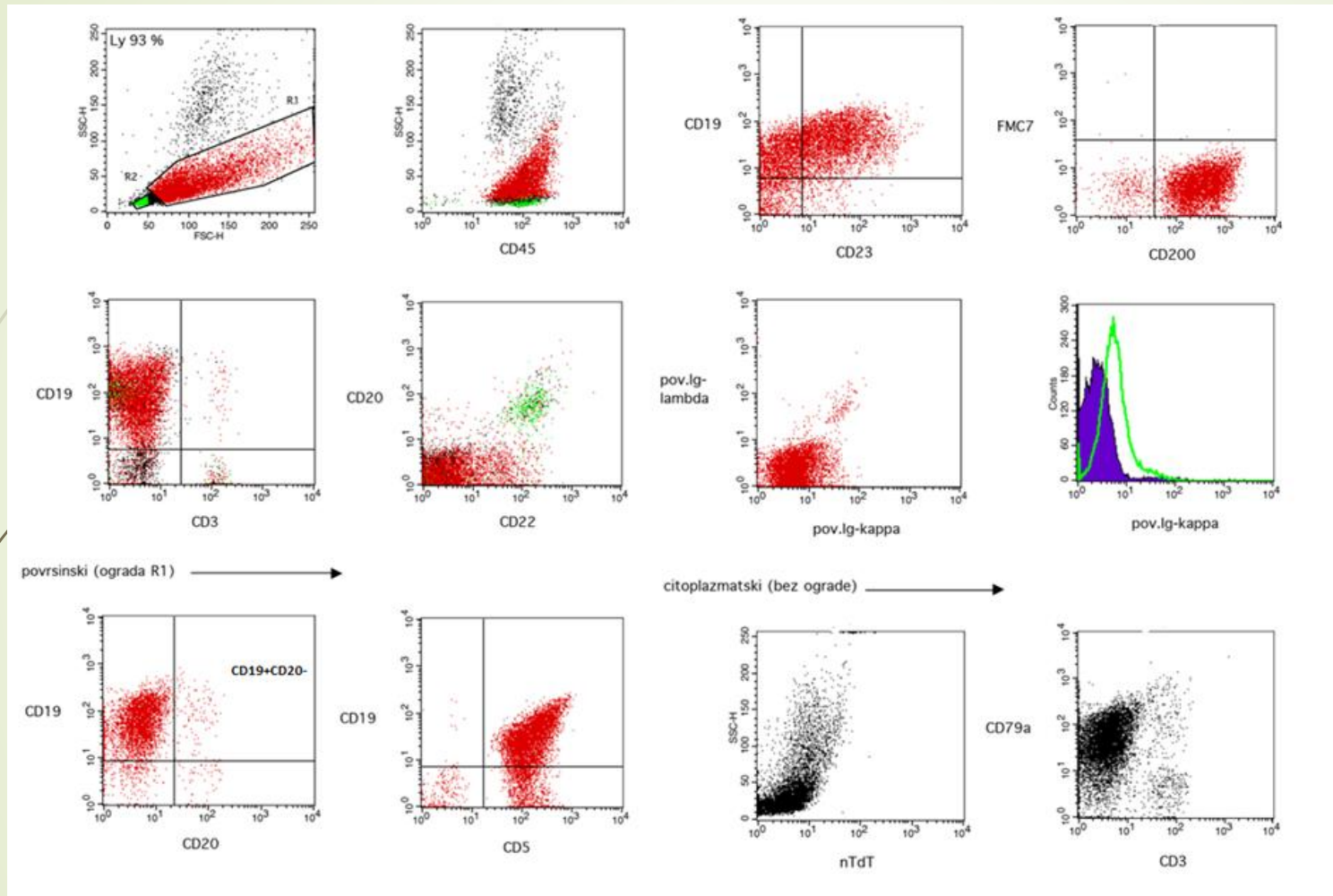


- Imunofenotipizacija limfocita koštane srži (a) i limfnog čvora (b)
- KS - manji imfociti KLL-a – **zeleno**, veći limfociti DLBCL-a – **crveno**
- Primarni DLBCL (obično CD5-, CD10+), RS stanice imaju KLL-imunofenotip (CD5+, CD10-) !

# Periferne CD20-negativne B-limfocitne neoplazme

- **CD20** - glikozilirani fosfoprotein – **pan-B biljeg** - na površini **svih** B-limfocita
- Ciljni antigen anti-CD20 th
  
- **CD20-negativni B-NHL** - rijetki -1-2 % svih limfoma B-limfocita
- Primarni ili relaps nakon th R (anti-CD20)
  
- Ekstranodalna lokalizacija, atipična morfologija, atipične fenotipske aberacije, agresivni klinički tijek, otpornost na standardnu kemoterapiju, loša prognoza
  
- Najčešći CD20- B-NHL: KLL, DLBCL, plazmablastični limfom (HIV, EBV), itd.
- Dijagnostički + terapijski problem !

# CD20-negativni B-KLL

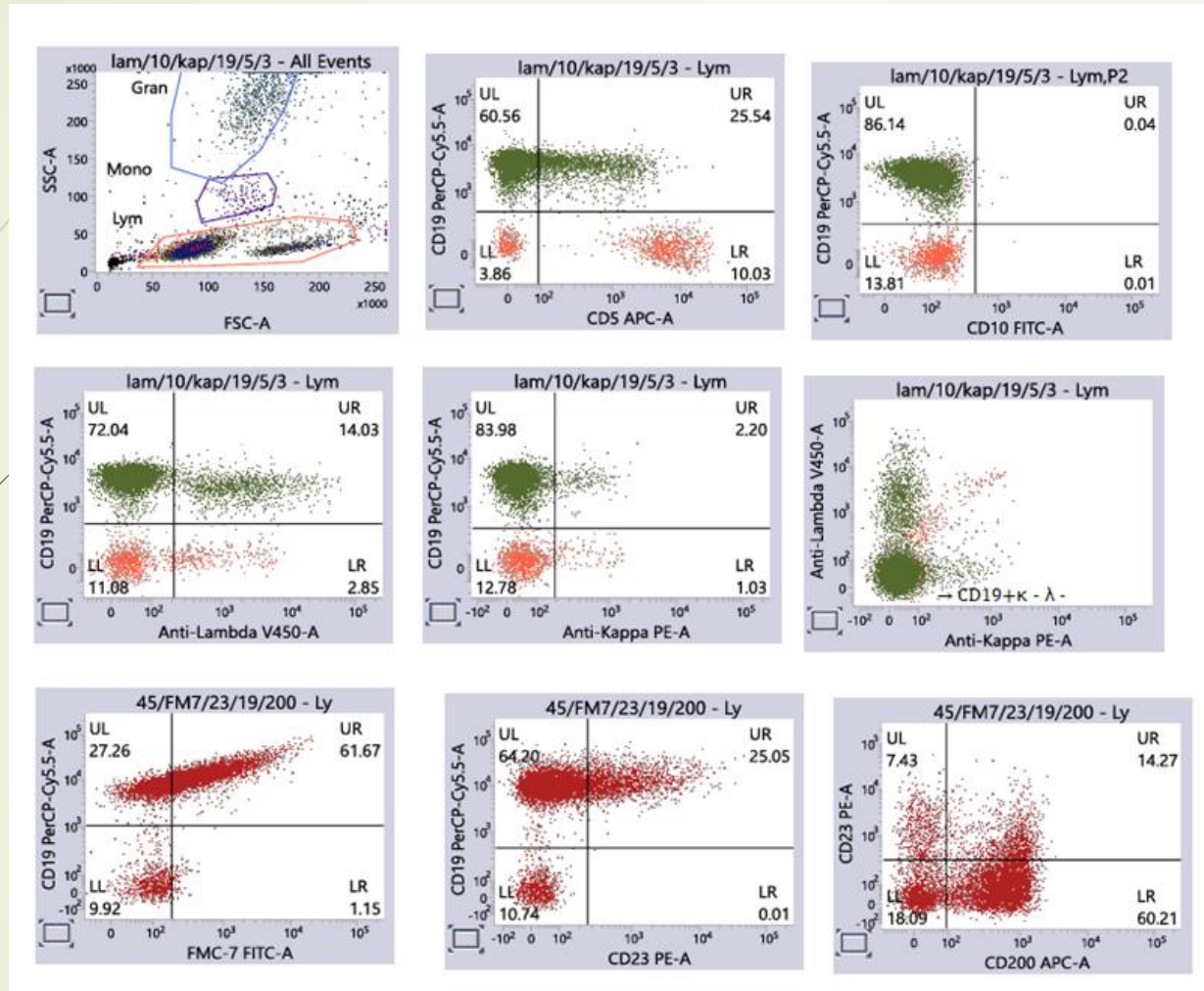


- Imunofenotipizacija stanica periferne krvi CD20-negativnog B-KLL-a
- Stanice B-KLL-a (R1 crveno) - tipični imunofenotip CD5+, CD19+, CD23+, CD200+, cyCD79a+, sKappa+(slabo), ali su negativne na CD20 i djelomično negativne na CD22
- Normalni B-limfociti (R2 zeleno) - tipični imunofenotip zdravih B-limfocita (CD19+, CD20+, CD22+).

# Nesekretorni B-NHL

- Izostanak ekspresije površinskog lakog lanca (slg  $\kappa$  ili  $\lambda$ ) u B-NHL-u, uključujući KLL
- javlja se u približno 3–12 % slučajeva
- komplicira dijagnozu pomoću protočne citometrije – klonalnost ?
- Važno razlikovati: nemogućnost stvaranja lakih lanaca / niska ekspresija ili tehnički čimbenici (npr. suvišak antigena)

# Nesekretorni B-NHL



- Imunofenotizacija limfocita periferne krvi pacijenta s nesekretornim B-NHL-om
- B-limfociti pokazuju aberantni imunofenotip (CD5±CD19+FMC+(jaki)CD23±CD200+
- izostanak izražaja lakih lanaca imunoglobulina (zeleno CD19+κ-λ-) - nije moguće dokazati njihovu monoklonalnost.



**Zaključno...**

**Protočná citometrija...**

**umjetnost, ludost ili nešto treće ?**

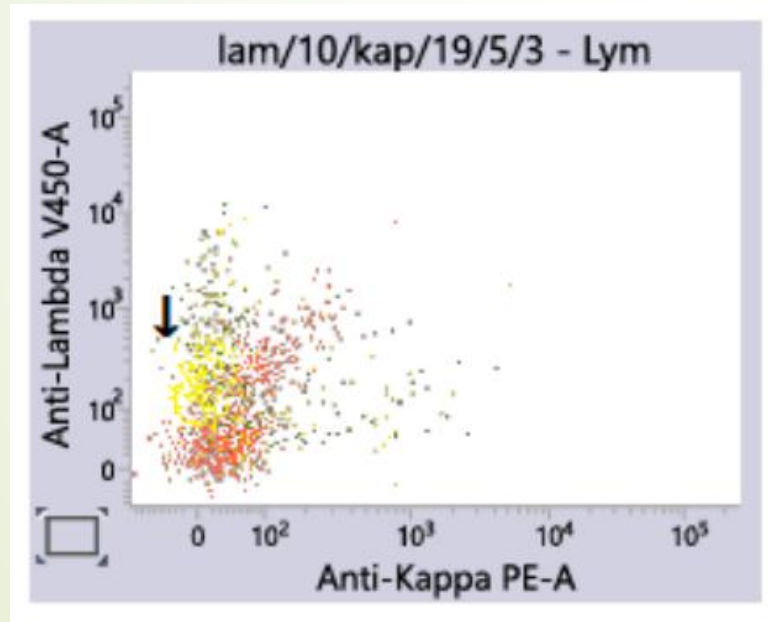


# 5 hirova protočne citometrije



# 1. Brojevi NE ZNAČE (gotovo) NIŠTA

- Rezultat kao broj – ne postoji
- Referentni interval – ne postoji / neupotrebljiv
- Postoji samo imunofenotip
- Brojevi mogu čak i lagati !



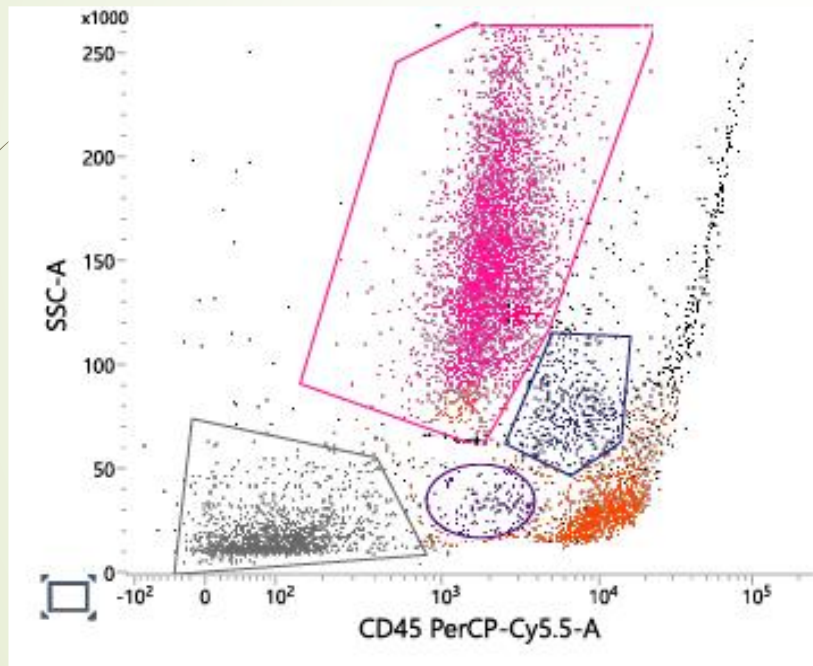
- Omjer lanac (brojčano) uredan, a prisutan mali klon

## 2. Nema klasičnog QC-a

- Više kontrola nego i jedna druga metoda – nijedna od pomoći kad stvarno treba...
  - CS&T – kontrola protoka, optike i elektronike
  - IgG1/IgG2/IgG3 – izotipska neg. kontrola – nespec. vezanje
  - FMO – *fluorescence – minus – one* - poz/neg diskriminacija
- } Prelievanje  
(*background*)  
fluorescencije u druge  
kanale
- UK NEQAS – vanjska kontrola – 2 dijela – tehnički i klinički
  - Hipocelularni uzorci – punktati – svaka stanica mora biti pametno iskorištena !

# 3. Komunikacija u slikama i bojama

- FCI rječnik u slikama i bojama
- Slika govori više od 1000 riječi !



„ L'art pour lab ”

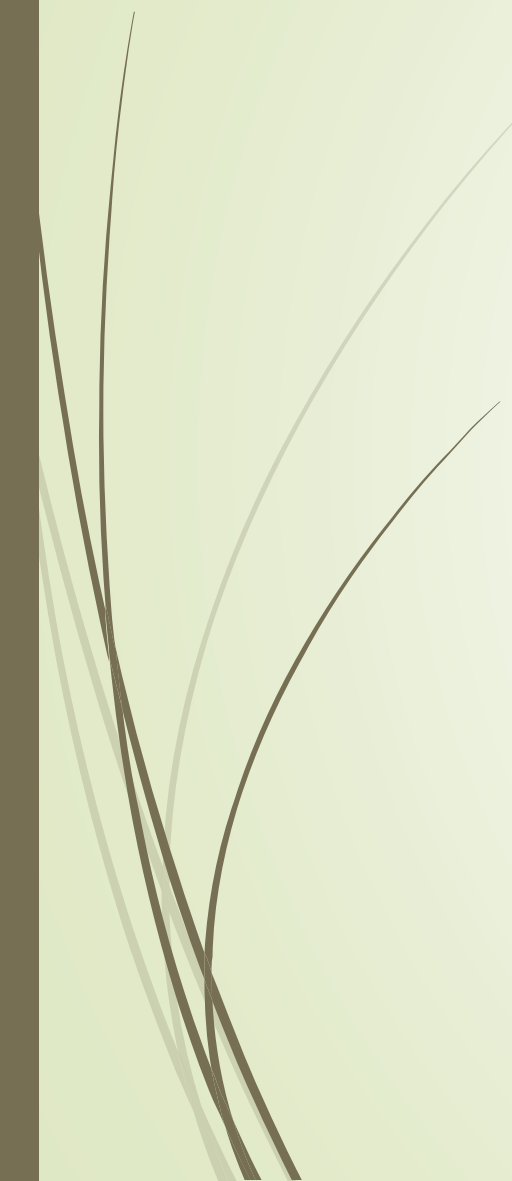


## 4. Donošenje dijagnoze

- Odgovornost koja nadilazi ostale grane medicinske biokemije:  
rezultat uz referentni interval
- FCI:  
imunofenotip + dijagnoza



## 5. Instinkt vs pravila

- ▶ Vjerovanje instinktu (iskustvu) i kad pravila govore suprotno...
  - ▶ Danas mnoštvo aberacija i atipičnih fenotipova
  - ▶ Više iznimki nego pravila - smjernice ne mogu sve (stići) obuhvatiti
- 



**Protočna citometrija**

**hirovita,**

**ali prelijepa...**





**Hvala na pažnji !**