

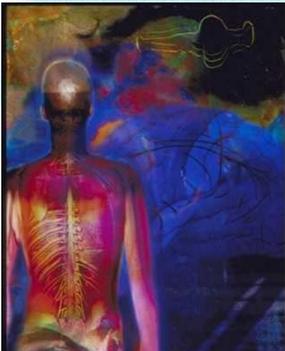
# Workshop Leucemia Linfática Crónica



## Inmunofenotipo de LLC

Rol de la Citometría de flujo

11 de Noviembre de 2016



Dra. Carmen Cao Pochintesta  
Hematóloga

# Citometría de flujo

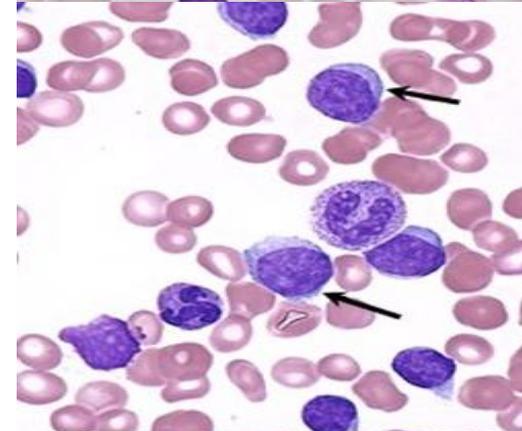
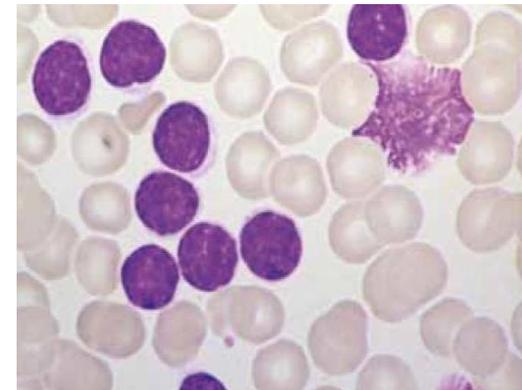
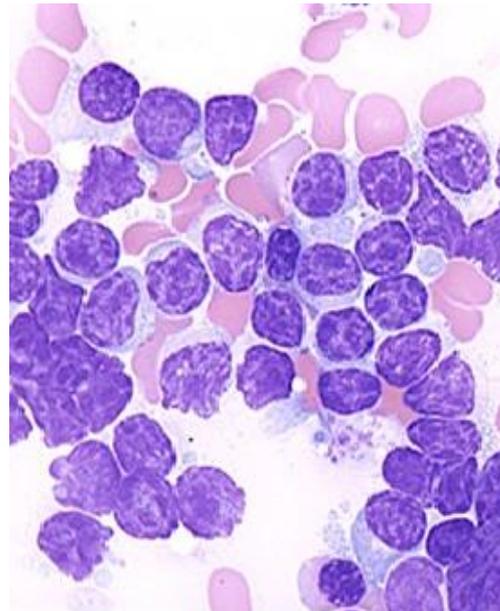
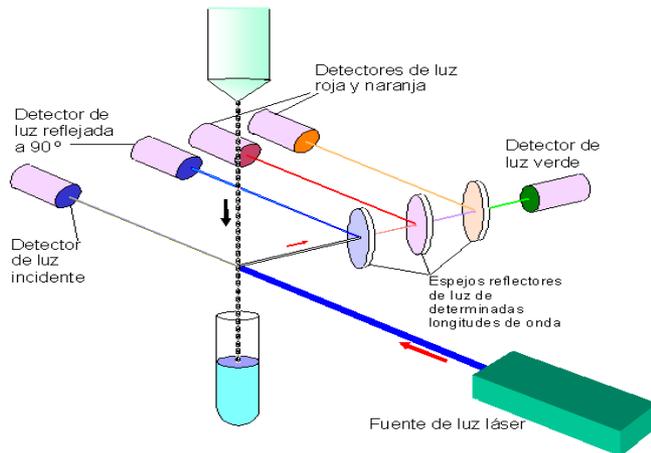


Hematología  
Inmunología



# Microscopía óptica

LLC

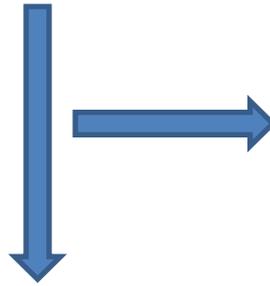


Preparación de la muestra

Adquisición

Análisis

Interpretación de resultados



2 horas

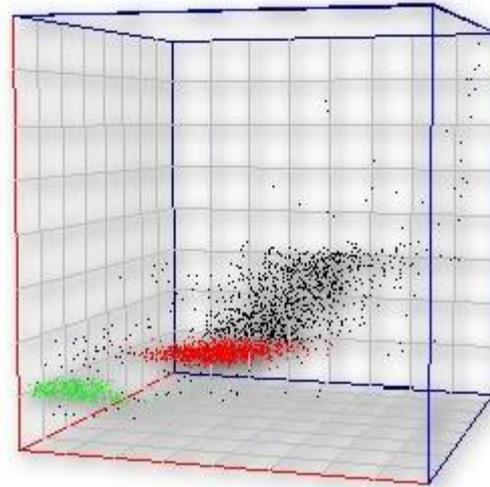


## Análisis multiparamétrico

Proporciona información sobre:

- Tamaño (FSC) y complejidad (SSC) de las células.
- Expresión de antígenos de superficie e intracitoplasmáticos e intranucleares
- Expresión de intensidades medias de fluorescencia variables

- Rapidez
- Especificidad
- Elevada sensibilidad ( $10^{-4}$  ó  $10^{-5}$ )
- Análisis Reproducible



## CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LLC

<b>Clasificación WHO 2016<sup>a</sup></b>	
<b>Linfocitos en sangre periférica (<math>\times 10^9/l</math>)</b>	$>5^b$
<b>Morfología</b>	Linfocitos pequeños y maduros sin nucléolos visibles. Sombras nucleares características.
<b>Inmunofenotipo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Más de un marcador de célula B (CD19, CD20 o CD23) y positividad de CD5, CD20, CD79b, de intensidad baja en comparación con linfocitos B normales, CD160 y CD200</li> <li>✓ Expresión monoclonal de cadenas <math>\kappa</math> o <math>\lambda</math></li> <li>✓ Inmunoglobulinas de superficie de baja intensidad</li> </ul>
<b>Células atípicas en sangre periférica Prolinfocitos</b>	$<55\%$ o $<15 \times 10^9/l$
<b>Duración de la linfocitosis</b>	$>$ de 3 meses
<b>Linfocitos en médula ósea (%)</b>	$> 40\%$ , pero el estudio en médula ósea no es imprescindible <sup>c</sup>

NCI: National Cancer Institute LLC: leucemia linfática crónica.; **a** Workshop Internacional de LLC.

**b** Una cifra menor en ausencia de citopenias, organomegalias o síntomas relacionados con la LLC, define la entidad reconocida como linfocitosis B monoclonal persistente; **c** A pesar de esto, el patrón de infiltración medular es útil para el pronóstico. El estudio medular puede aclarar la causa de las citopenias asociadas.

## CLASIFICACIÓN PREDICTIVA Y PRONÓSTICA

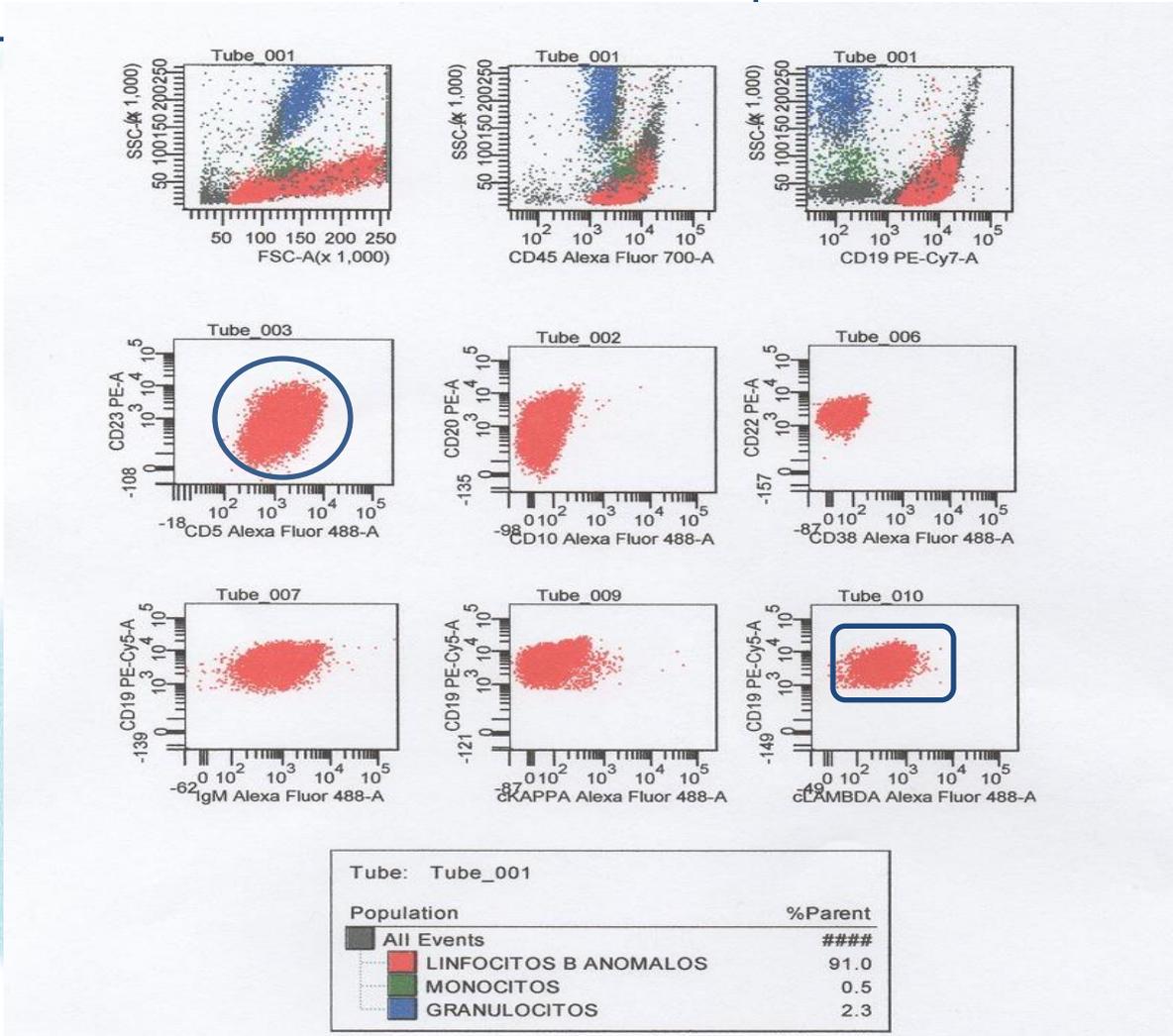
### Factores predictivos desfavorables

✓ Edad avanzada con comorbilidades	✓ Del 17 p(FISH)/Mutaciones de TP53
✓ Estadío avanzado al diagnóstico (III-IV)	✓ Del11q
✓ Patrón difuso de infiltración medular	✓ IgVH mutado
✓ Sexo masculino	✓ Expresión elevada de ZAP70 ( $\geq 20\%$ )
✓ Niveles elevados de LDH	✓ Expresión elevada de CD38 ( $\geq 30\%$ )
✓ Niveles elevados de $\beta 2$ -microglobulina	✓ Mutaciones en NOTCH1 o SF3B1
	✓ Expresión alterada de micro-RNAs
	✓ Cariotipo complejo

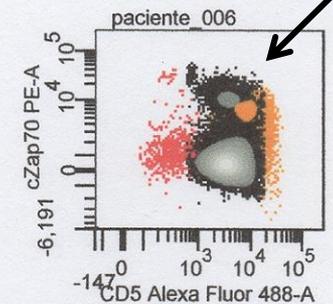
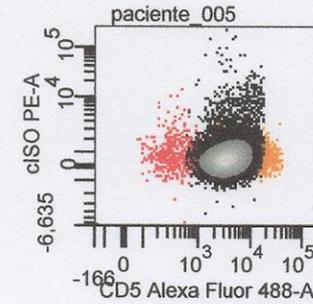
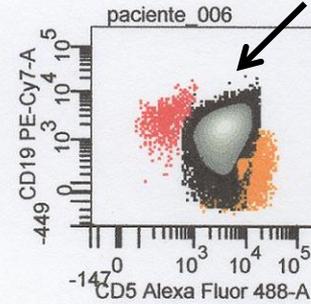
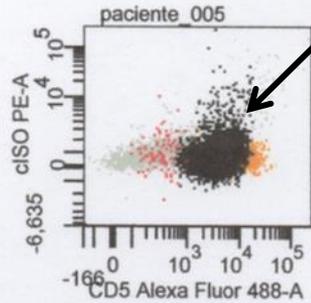
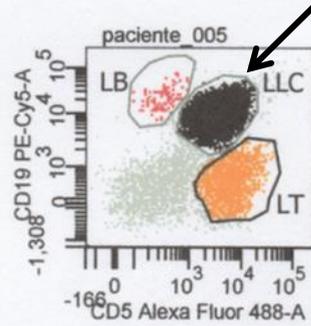
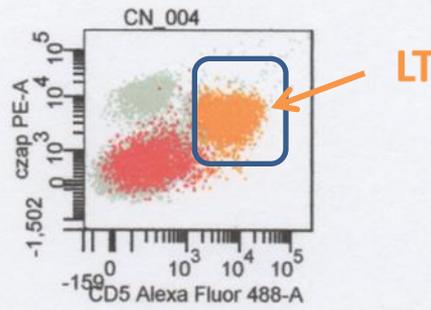
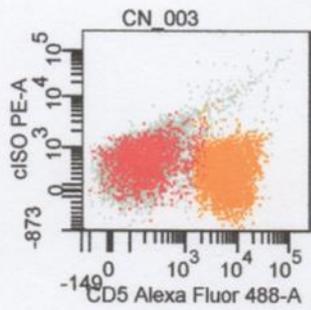
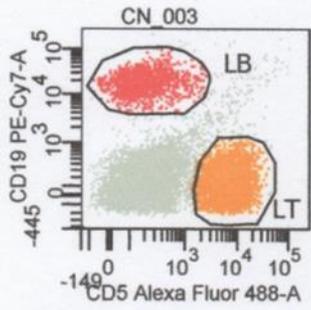
Imunofenotipo

- ✓ Más de un marcador de célula B (CD19, CD20 o CD23) y positividad de CD5, CD20, CD79b, de intensidad baja en comparación con linfocitos B normales, CD160 y CD200
- ✓ Expresión monoclonal de cadenas  $\kappa$  o  $\lambda$
- ✓ Inmunoglobulinas de superficie de baja intensidad

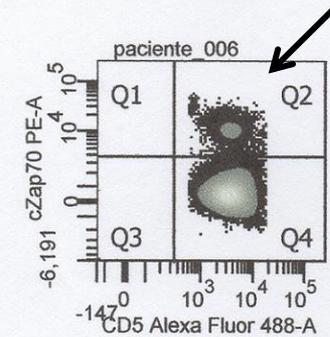
SP



IF: CD5+i., CD23+h., CD20+h., CD10(-), CD22+i., CD38(-), CD19+, sIgM+, lambda+



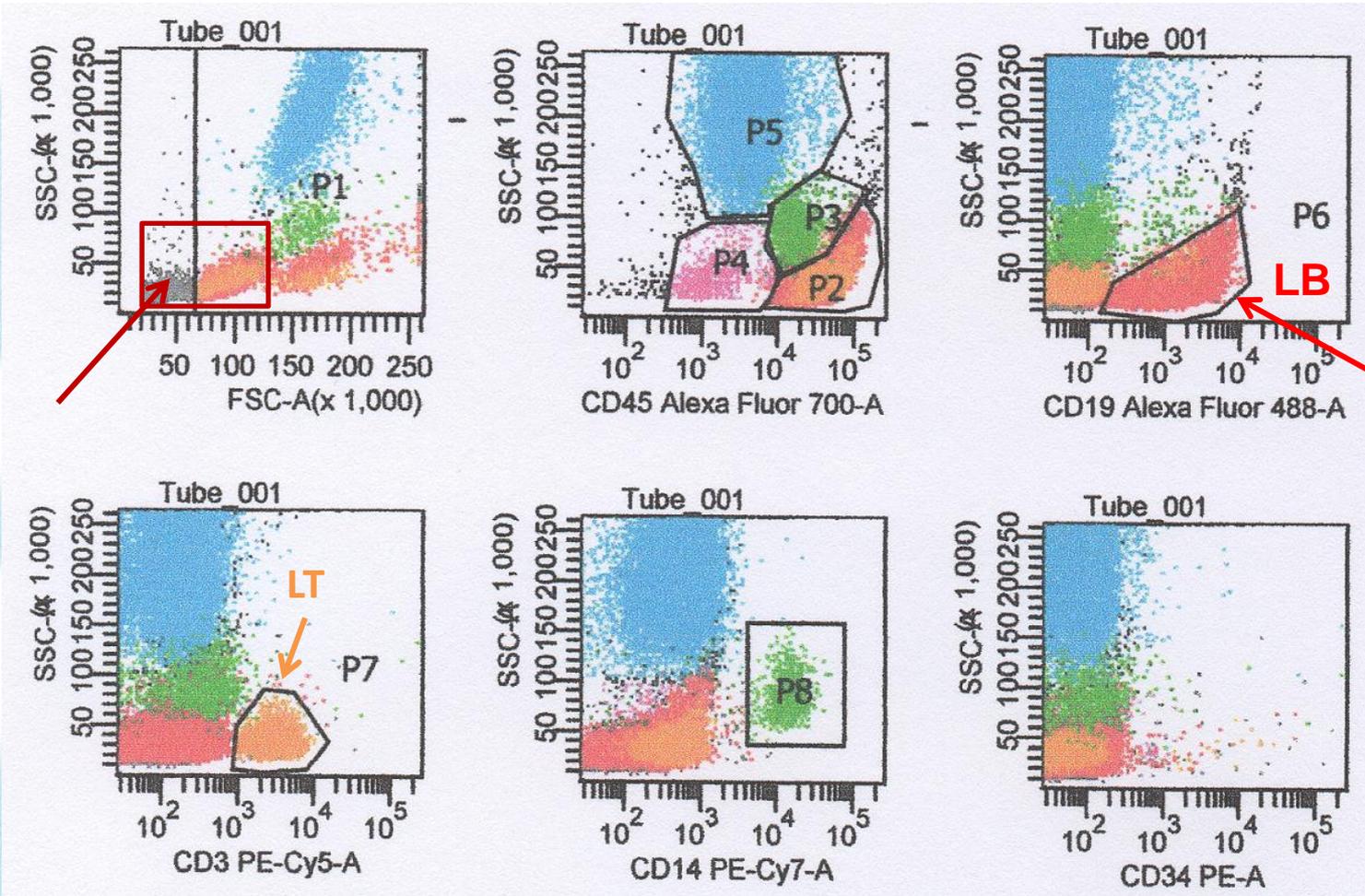
**CD5+, cZAp70+ = 9.2%**



Population	%Parent	cZap70 PE-A Mean
☒ Q2	9.2	11,439
☒ Q4	90.8	541

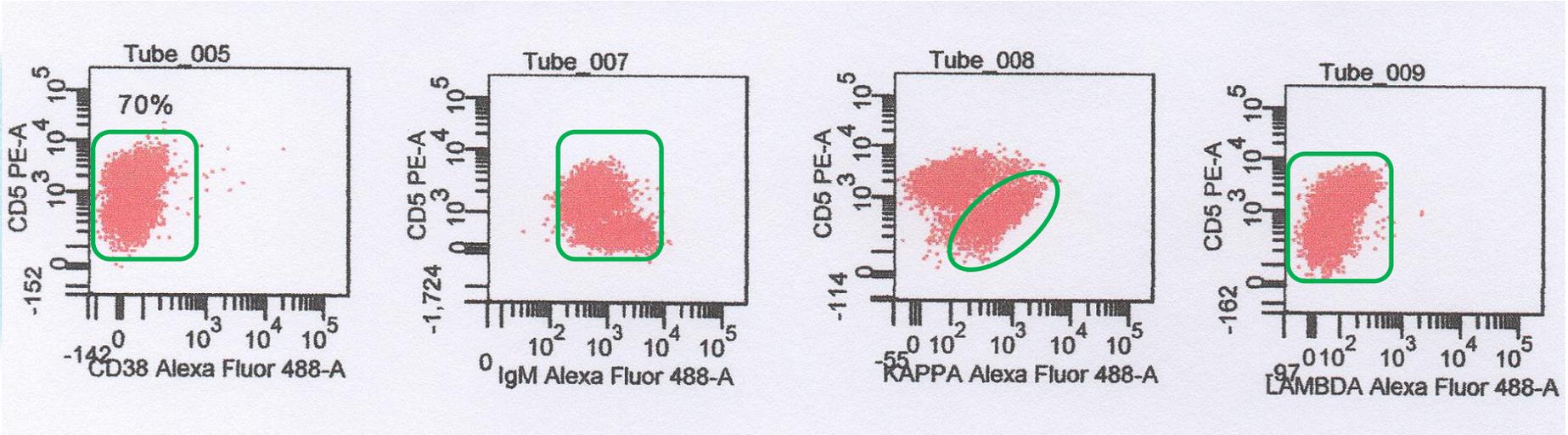
**FACSDiva Version 6.1.3**

✓ Expresión elevada de ZAP70(≥20%)



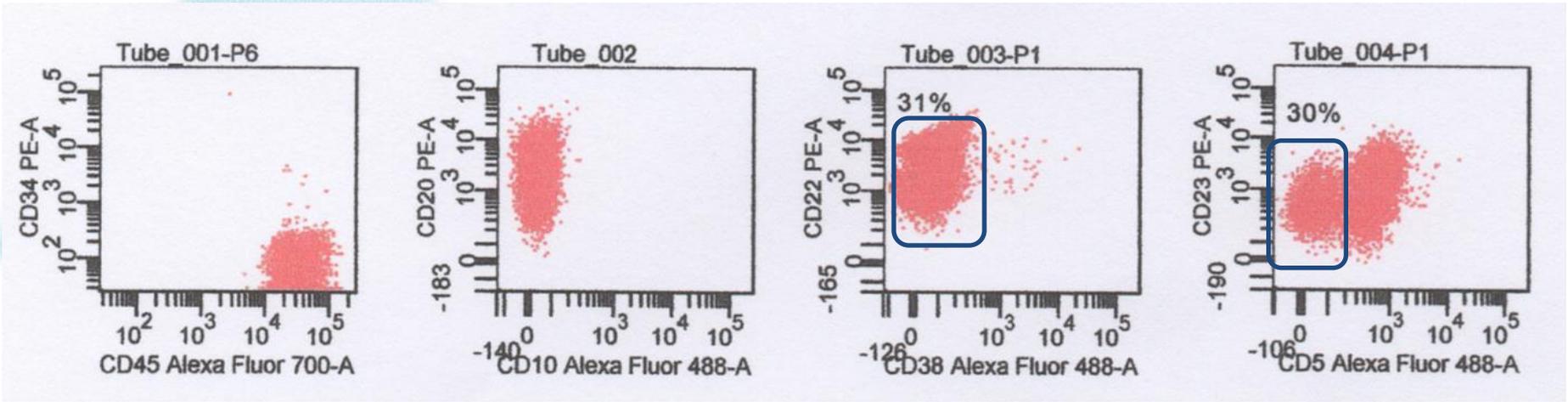
**LB = 68%**

<p>Inmunofenotipo</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Más de un marcador de célula B (CD19, CD20 o CD23) y positividad de CD5, CD20, CD79b, de intensidad baja en comparación con linfocitos B normales, CD160 y CD200</li> <li>✓ Expresión monoclonal de cadenas κ o λ</li> <li>✓ Inmunoglobulinas de superficie de baja intensidad</li> </ul>
-----------------------	--



**CD45+i., CD20+h, CD23+i., CD5+i., CD22+p., CD38(-), sIgM+, ckappa+, monoclonales**

**FMC7+**



**FMC7(-)**

**CD45+i., CD20+h, CD23+i., CD5(-), CD22+p., CD38(-), sIgM+ = prolinfocitos**

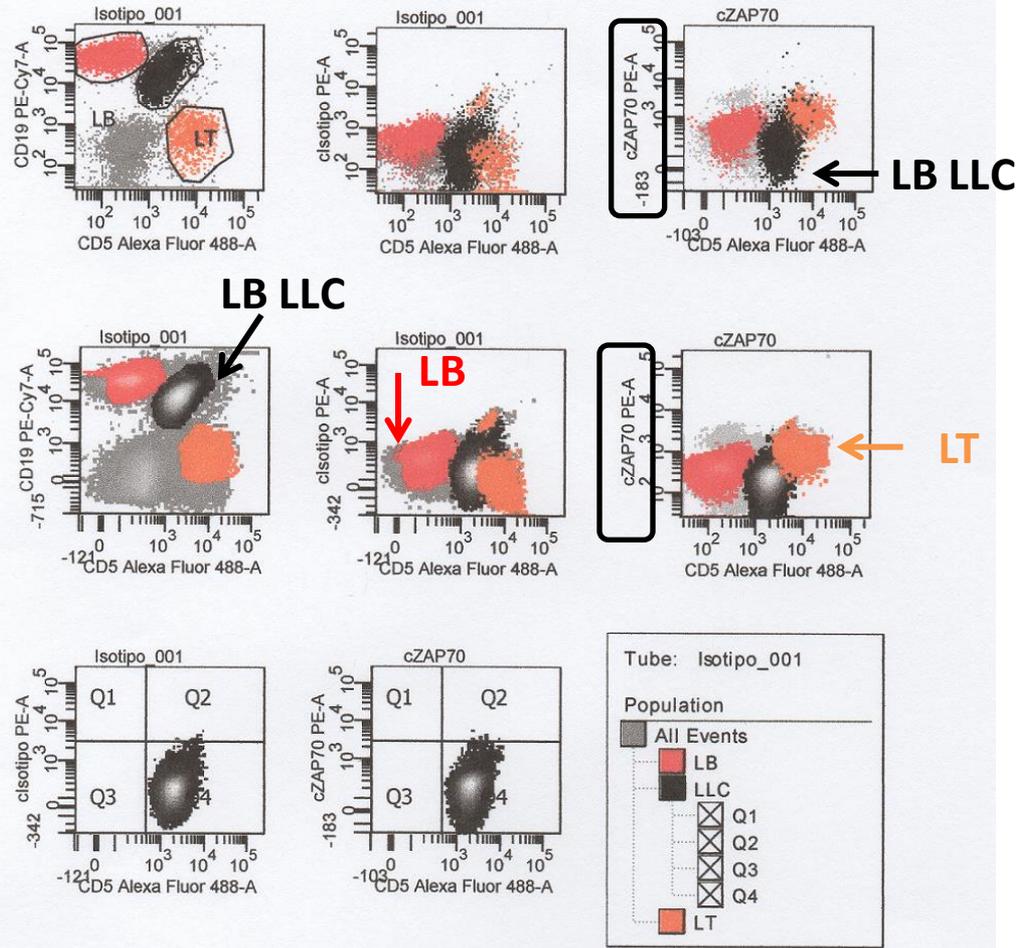
## Caso 2

### Inmunofenotipo

- ✓ Más de un marcador de célula B (CD19, CD20 o CD23) y positividad de CD5, CD20, CD79b, de intensidad baja en comparación con linfocitos B normales, CD160 y CD200
- ✓ Expresión monoclonal de cadenas  $\kappa$  o  $\lambda$
- ✓ Inmunoglobulinas de superficie de baja intensidad

✓ Expresión elevada de ZAP70 ( $\geq 20\%$ )

✓ Expresión elevada de CD38 ( $\geq 30\%$ )



IMF :  
cZap70 (-)

# LLC típica vs. Linfocitosis B monoclonal vs. Linfoma linfocítico

Patrón inmunofenotípico  
CD20+d., CD5+, CD23+, CD10(-), sIgM+d., monoclonal

+

Linfocitosis en SP > o < 5.000/mm<sup>3</sup>.

Morfología

< 5.000/mm<sup>3</sup>

> 5.000/mm<sup>3</sup>

Adenopatías, esplenomegalia,  
citopenias y síntomas B

**LLC**

SI

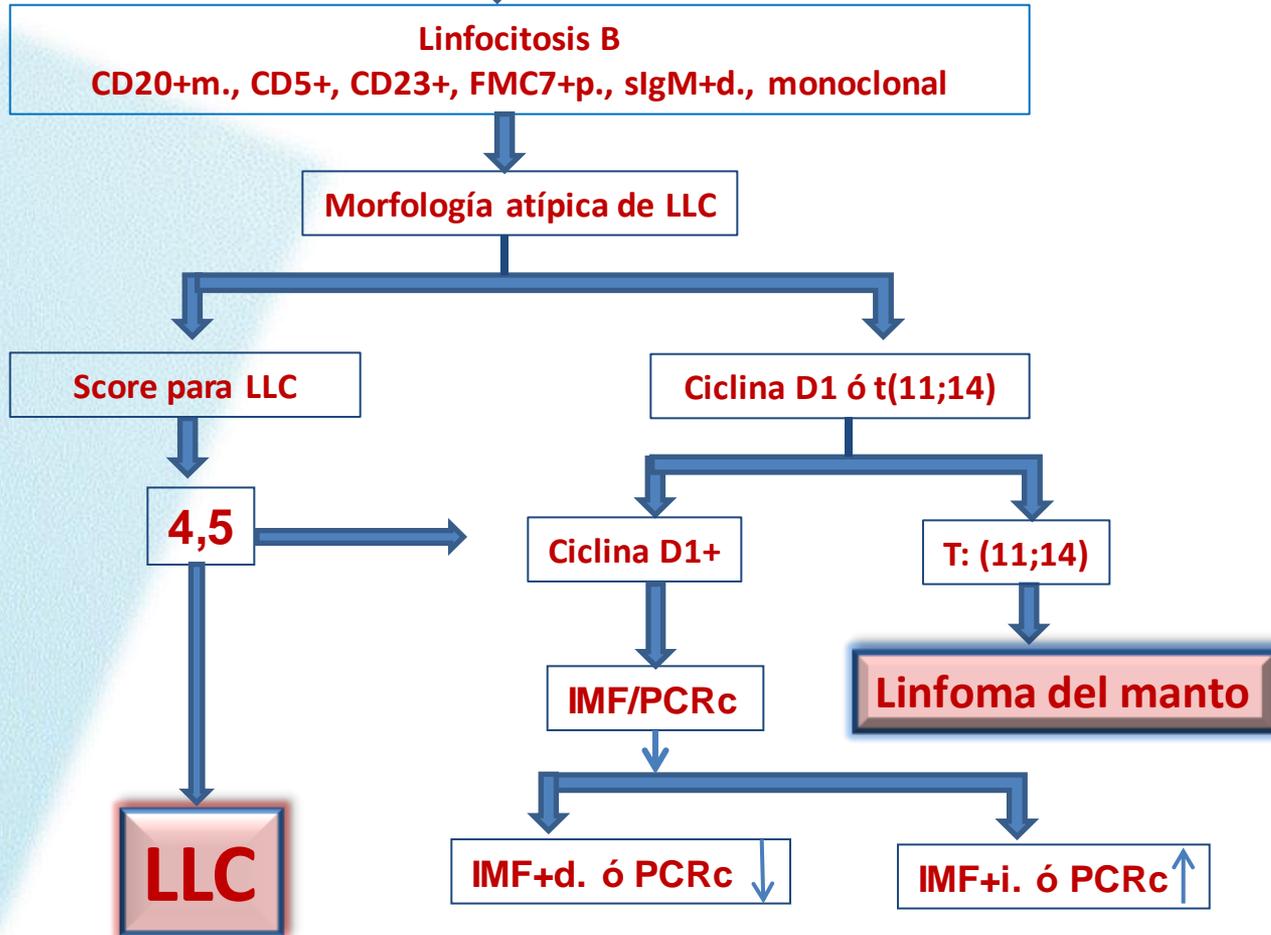
NO

**Linfoma linfocítico**

**Linfocitosis B monoclonal**

# LLC atípica vs. LLC/PL vs. Linfoma del manto

IF típico de LLC vs. Morfología atípica LLC vs. L.del manto  
IF atípico + Morfología típica vs. L.del manto



# ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

Sensibilidad de la CMF  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$

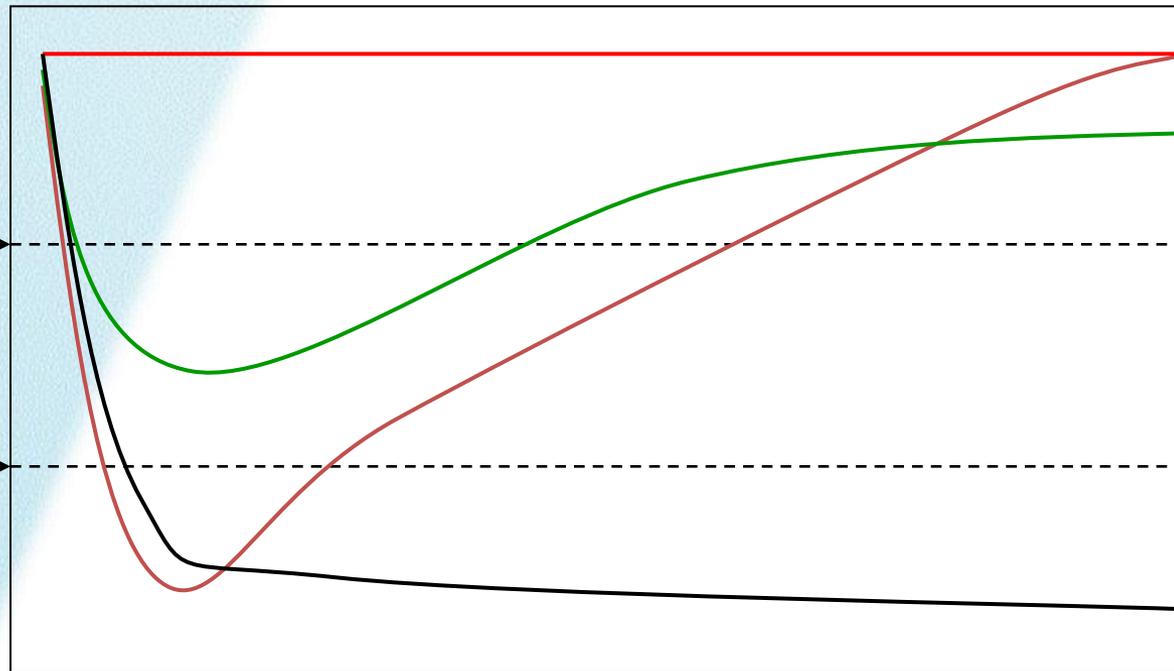
% células leucémicas en M.O.

MORFOLOGÍA  
CITOGÉNÉTICA

5%

PCR  
CITOMETRÍA

$10^{-5}$



Tiempo

## ERM en la LLC

- **La utilidad clínica de ERM**
  - **Predicción de la SLP y la SG**
  - **Las variables con impacto pronóstico**
  
- **Niveles de Tratamiento**
- **La estadificación clínica**
- **Las características adicionales de riesgo**
- **Tiempo óptimo de evaluación**
- **¿Sangre periférica o médula ósea?**
- **Cinética de proliferación celular**
  
- **Aspectos técnicos**
  - **Comparación de la C.de Flujo vs. ASO IGH RQ-PCR**
  - **EuroFlow8 CLL : ERM**

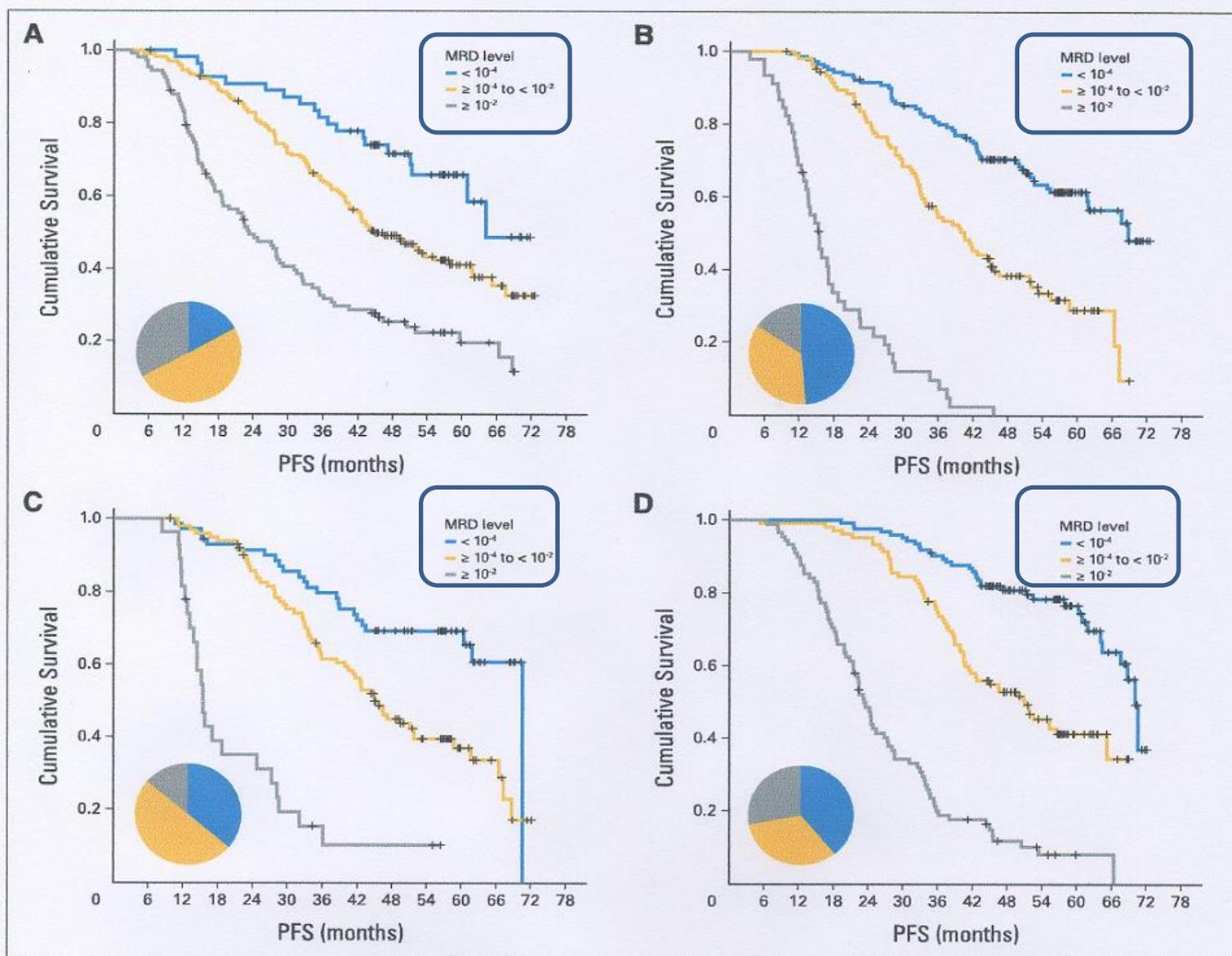
## Minimal Residual Disease Quantification Is an Independent Predictor of Progression-Free and Overall Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Multivariate Analysis From the Randomized GCLLSG CLL8 Trial

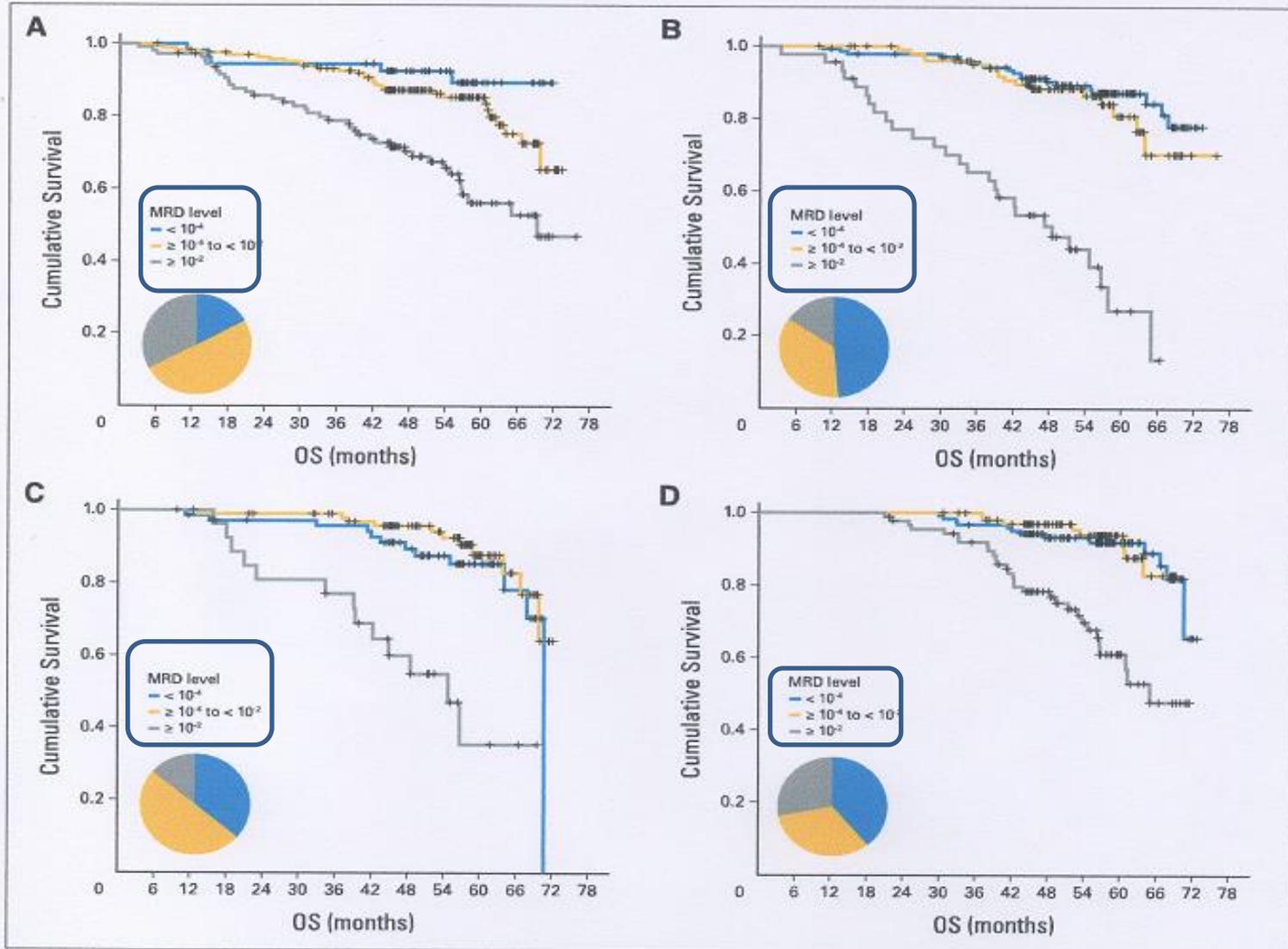
*Sebastian Böttcher, Matthias Ritgen, Kirsten Fischer, Stephan Stilgenbauer, Raymonde M. Busch, Günter Fingerle-Rowson, Anna Maria Fink, Andreas Bühler, Thorsten Zenz, Michael Karl Wenger, Myriam Mendila, Clemens-Martin Wendtner, Barbara F. Eichhorst, Hartmut Döhner, Michael J. Hallek, and Michael Kneba*

### **Purpose**

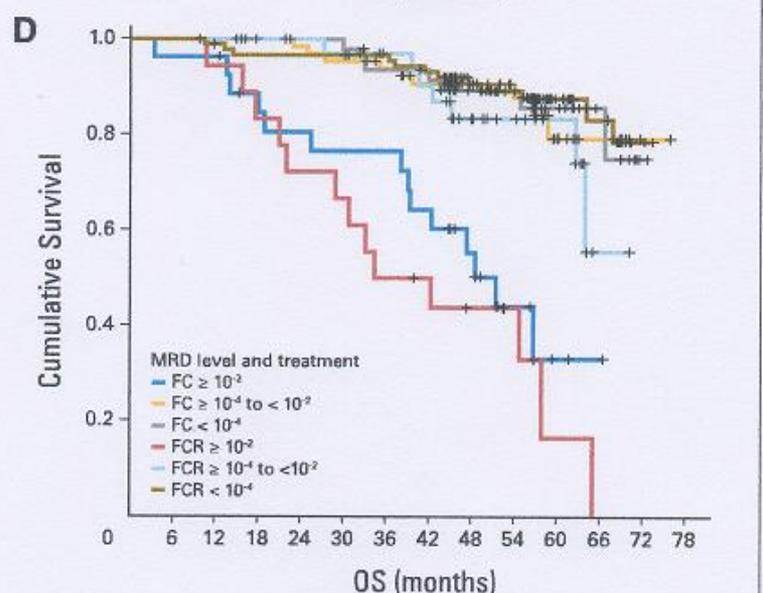
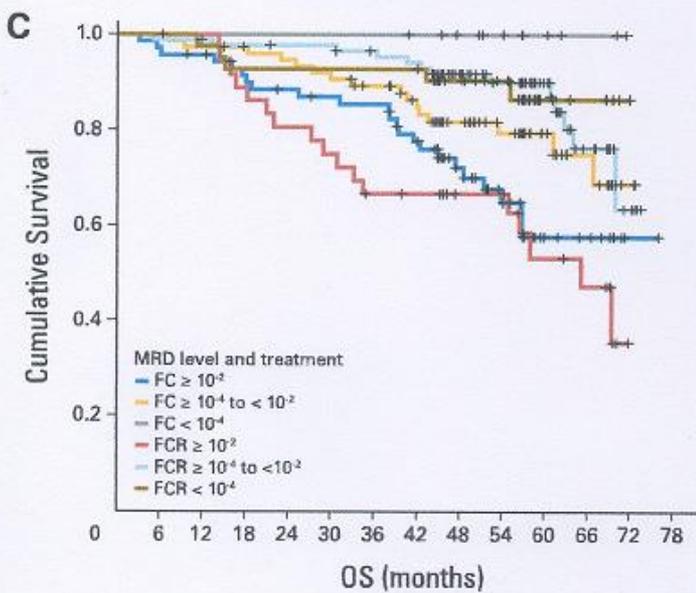
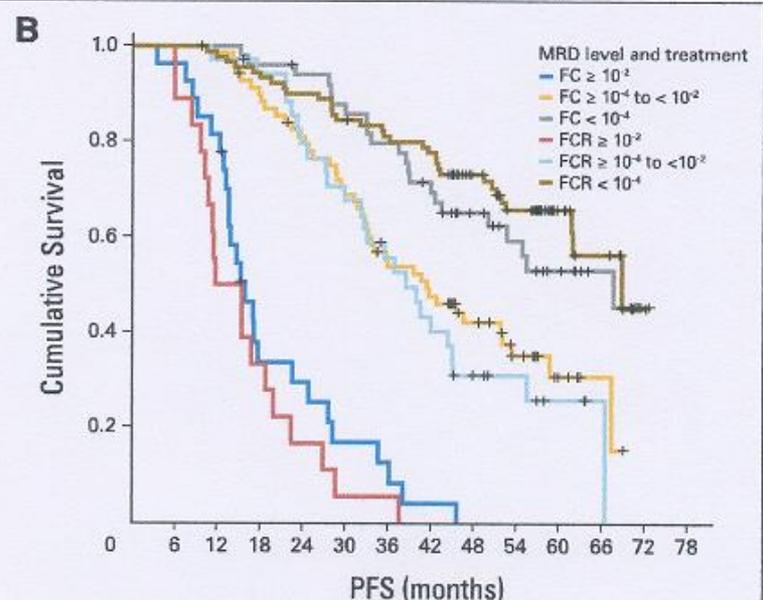
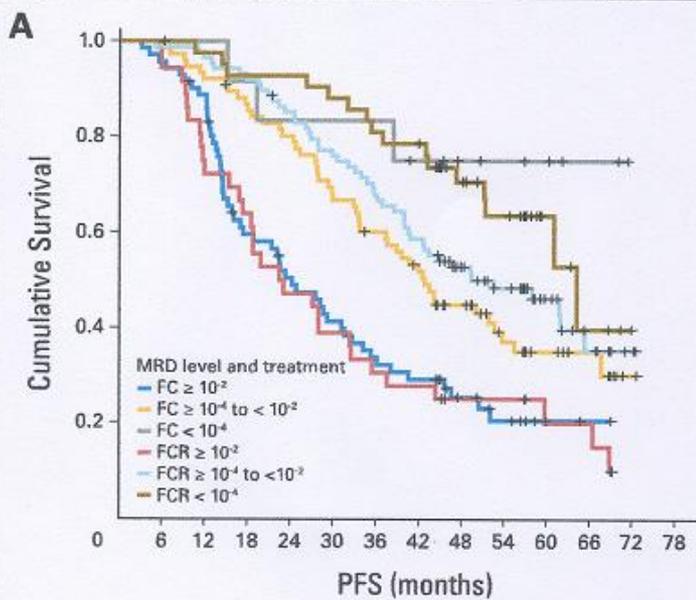
To determine the clinical significance of flow cytometric minimal residual disease (MRD) quantification in chronic lymphocytic leukemia (CLL) in addition to pretherapeutic risk factors and to compare the prognostic impact of MRD between the arms of the German CLL Study Group CLL8 trial.

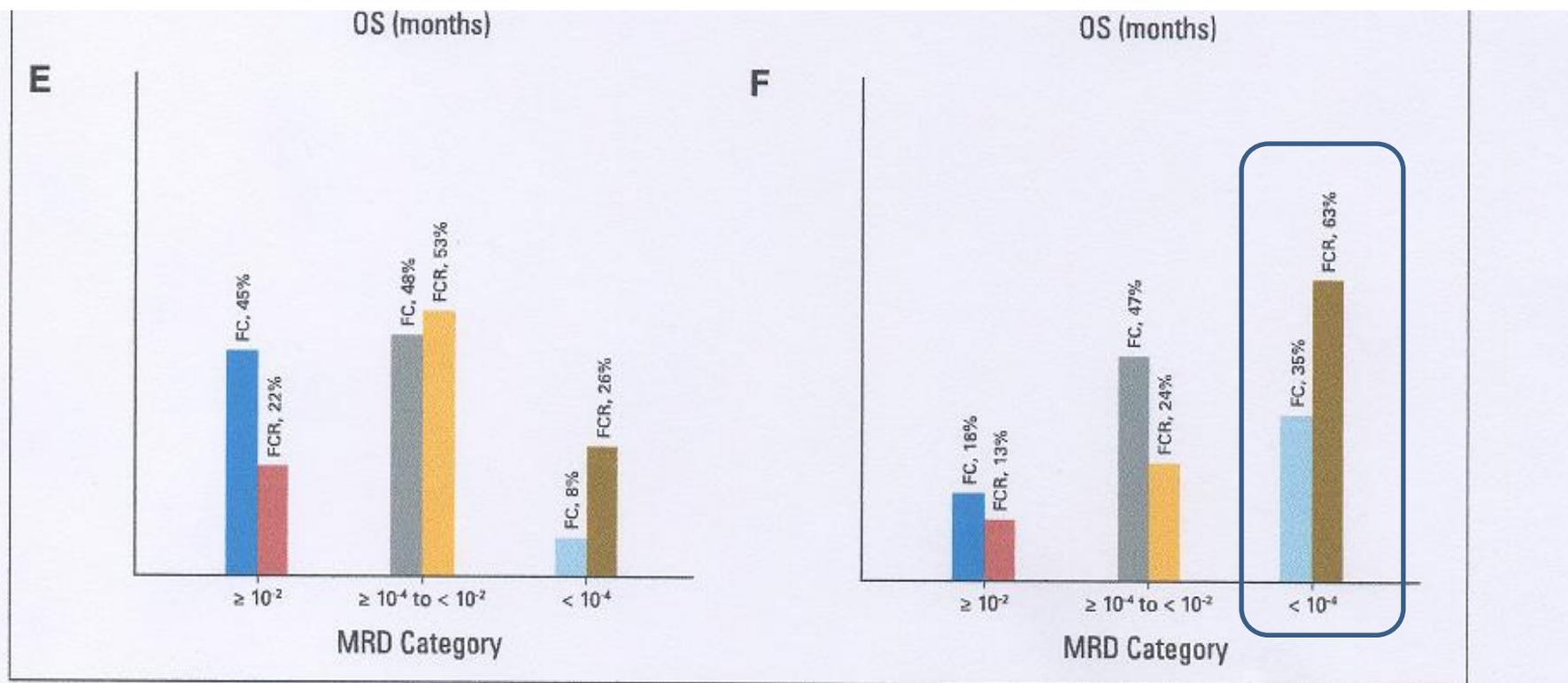
### MRD as Independent Predictor of PFS and OS in CLL





**Fig 4.** Overall survival (OS) in patients with chronic lymphocytic leukemia grouped by minimal residual disease (MRD) levels assessed (A) in peripheral blood (PB) at interim staging, (B) in PB at final restaging, (C) in bone marrow (BM) at final restaging, and (D) in PB during follow-up. The inserted pie charts represent the frequency distributions.  $P < .0001$  for all analyses by log-rank test.





**Fig 3.** (A, B) Progression-free survival (PFS) and (C, D) overall survival (OS) grouped by treatment regimen and by minimum residual disease (MRD) category assessed at interim staging (A, C, E) and at first restaging (B, D, F) in peripheral blood. Histograms E and F depict the frequency distributions of MRD groups at both analysis A, time points. Percentages in the histograms denote frequency within a treatment arm. FC, fludarabine and cyclophosphamide; FCR, FC plus rituximab.

### MRD as Independent Predictor of PFS and OS in CLL

**Table 2.** Multivariate Analysis of the Effects of Prognostic Factors on PFS and OS in Combination With PB MRD Levels Assessed at Interim Staging and at Final Restaging

Variable	PFS						OS					
	Interim Staging (n = 286)			Final Restaging (n = 254)			Interim Staging (n = 274)			Final Restaging (n = 243)		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
MRD level												
Overall			< .0001			< .0001			.03			< .0001
≥ 10 <sup>-4</sup> to < 10 <sup>-2</sup> v < 10 <sup>-4</sup>	1.88	1.11 to 3.20	.019	2.81	1.87 to 4.20	< .0001	1.48	0.50 to 4.33	.48	1.53	0.74 to 3.16	.25
≥ 10 <sup>-2</sup> v < 10 <sup>-4</sup>	3.65	2.10 to 6.36	< .0001	21.85	12.12 to 39.38	< .0001	2.98	1.01 to 8.84	.049	7.12	3.50 to 14.49	< .0001
Clinical response												
Overall			< .0001			.002			.021			
PR v CR	1.24	0.87 to 1.76	.24	1.11	0.75 to 1.65	.6	1.5	0.77 to 2.93	.24			
NR v CR	5.02	2.55 to 9.87	< .0001	3.96	1.78 to 8.81	.0007	3.97	1.46 to 10.8	.0071			
ECOG PS > 0							2.05	1.22 to 3.43	.0066	1.79	1.04 to 3.08	.035
Del(17p) present	3.08	1.74 to 5.46	.0001	3.6	1.75 to 7.40	.0005	5.64	2.77 to 11.46	< .0001	3.12	1.43 to 6.79	.0042
IGHV unmutated	2.23	1.55 to 3.21	< .0001	1.9	1.26 to 2.86	.0021						
Thymidine kinase ≥ 10 U/L							2.46	1.14 to 5.29	.02			
No. of treatment cycles < 6	1.71	1.15 to 2.55	.009									

NOTE. Blank spaces denote the lack of a significant association in multivariate analysis.

Abbreviations: CR, complete response; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; HR, hazard ratio; MRD, minimal residual disease; NR, nonresponder; OS, overall survival; PB, peripheral blood; PFS, progression-free survival; PR, partial response; PS, performance score.

1995



¿Hacia dónde vamos ? : Next generation flowcytometry

Gracias