Archive of SID

میزان عدم تطابق دو روش مورفولوژی/ سیتوشیمی و ایمونوفنوتایپ توسط فلوسیتومتر در تشخیص ۴۲۰ بیمار لوسمی حاد

دکتر فرید کوثری[۱]، دکتر نازیلا آزردگان[۱]، دکتر مسعود ستوده[۱]، مهین نیکوگفتار[۲]

Title: *Discrepancy between morphology/cytochemistry and flowcytometric immunophenotyping in 420 new cases of acute leukemia .*

Authors: *Kowsary F,(MD); Azordegan N,(MD); Sotoudeh M,(MD); Nikoogoftar M,(MSc).*

Abstract: *French-American-British (FAB) classification of acute leukemia is based on the morphologic examination of bone marrow smears and cytochemical staining of blast cells. New therapeutic measures however, mandate the use of flowcytometric immunophenotyping of acute leukemia.*

Comparison of the results of FAB classification and flowcytometric immunophenotyping confirms the value of immunophenotyping since, many distinct types of leukemia are known to warrant specific therapy and carry predictable prognoses.

In this study cytomorphology ,cytochemical staining characteristics and immunophenotyping of 420 new cases of acute leukemia were analyzed.

Flowcytometric immunophenotyping showed 280(66.7%) acute lymphoblastic(ALL), 135(32.1%) acute myeloid(AML), 3(0.7%)biphenotypic and 2(0.5%) unclassified cases. Of 280 cases designated as lymphoid by flowcytometry,257 were diagnosed as such by cytochemistry/morphology. Thus, the sensitivity and specificity of the latter for diagnosis of ALL was 91% and 82%, respectively.

Of 135 immunophenotypically proved acute myeloid leukemia, 115 cases were diagnosed as such by cytochemistry/morphology. Hence, the sensitivity of the test for diagnosis of AML was 85% and specificity 92%.

The results show the importance of immunophenotyping in routine diagnosis of new cases of acute leukemia for selection of appropriate treatment protocols.

Keywords: *acute myeloid leukemia(AML), acute lymphoblastic leukemia(ALL), flowcytometry, immunophenotyping, FAB subtypes.*

www.SID.ir

Archive of SID

۱- گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- بخش فلوسیتومتری، سازمان انتقال خون ایران

چکیده:

مطالعه مورفولوژیک گسترش‌های مغز استخوان همراه با رنگ‌آمیزی سیتوشیمی سلولهای بلاست اساس تقسیم‌بندی FAB(***فرانسوی وامریکایی وانگلیسی***) ***را تشکیل میدهد. اگرچه با تدابیر درمانی جدید استفاده از ایمونوفنوتایپ توسط فلوسیتومتر در تشخیص لوسمی‌های حاد ضروری میباشد.***

هدف از این مطالعه مقایسه نتایج بدست آمده از تقسیم‌بندی FAB ***با نتایج ایمونوفنوتایپ توسط فلوسیتومتر در تشخیص لوسمی حاد و همچنین تأکید بر ارزش ایمونوفنوتایپ بدلیل تفاوت در رژیم درمانی و پیش آگهی درانواع مختلف لوسمی می باشد.***

آسپیراسیون مغز استخوان ۴۲۰ بیمار مبتلا به لوسمی حاد از نظر خصوصیات مورفولوژی/ سیتوشیمی وایمونوفنوتایپ بررسی شد. تقسیم‌بندی این بیماران که توسط فلوسیتومتری انجام شد به قرار زیر است:

۲۸۰ مورد(۶۶/۷٪) لوسمی لنفوبلاستیک، ۱۳۵ مورد(۳۲/۱٪) لوسمی میلوئید، ۳مورد(۰/۷٪) biphenotypic ***و ۲ مورد(۰/۵٪)*** unclassified .

از ۲۸۰ مورد لوسمی که توسط فلوسیتومتری از رده لنفوئید گزارش شده بود ۲۵۷ مورد با روش مورفولوژی/ سیتوشیمی نیز بعنوان رده لنفوئید گزارش شده بود. لذا حساسیت روش اخیر (FAB***) جهت تشخیص*** ALL ***۹۱٪ و ویژگی آن به ۸۲٪ میرسد.***

از ۱۳۵ مورد لوسمی میلوئید حاد که توسط ایمونوفنوتایپ ثابت شده بود ۱۱۵ مورد با روش مورفولوژی/ سیتوشیمی نیز بعنوان لوسمی میلوئیدی گزارش شده بود. به این ترتیب حساسیت روش FAB ***جهت تشخیص*** AML ***۸۵٪ و ویژگی آن به ۹۲٪ میرسد. ۳ مورد لوسمی*** biphenotypic ***و ۲ مورد*** unclassified ***(اثبات شده توسط فلوسیتومتری)، در آزمایش مورفولوژی/ سیتوشیمی بعنوان لوسمی لنفوئیدی گزارش شده بود.***

با مقایسه نتایج بدست آمده از مورفولوژی/ سیتوشیمی بر طبق تقسیم بندی FAB ***با نتایج فلوسیتومتری، این مطالعه تأکید بر اهمیت بررسی آسپیراسیون مغز استخوان توسط فلوسیتومتری جهت تشخیص قطعی و انتخاب پروتوکل درمانی مناسب دارد.***

گل‌واژگان: ***لوسمی میلوئید حاد، لوسمی لنفوبلاستیک حاد، فلوسیتومتری، ایمونوفنوتایپ، زیر گروه‌های*** FAB .

مقدمه:

تقسیم بندی لوسمی حاد از گذشته بر طبق معیارهای پیشنهادی گروه FAB و بر اساس خصوصیات مورفولوژی/ سیتوشیمی انجام میشده است(۱). اگر چه در حال حاضر مطالعات ایمونوفنوتایپ جهت تشخیص قطعی انواع لوسمی ها امری ضروری می باشد(۲).

استفاده از این روش بخصوص در مورد تشخیص لوسمی میلوئید از نوع M0,M7,M3v و انواع لوسمی‌های biphenotypic, mixed lineage و نیز جهت تعیین رده سلولی لوسمی حاد لنفوبلاستیک، حائز اهمیت می‌باشد(۳).

توانائی ایمونوفنوتایپ به روش فلوسیتومتری برای مشخص نمودن انواع مختلف لوسمی حاد با پیش آگهی و رفتار بالینی متفاوت، پزشک معالج را قادر می‌سازد تا مناسب‌ترین روش‌درمانی را برای بیماران مبتلا به لوسمی انتخاب کند(۴).

این مطالعه جهت تأکید بر انجام مطالعات ایمونوفنوتایپ در کنار مطالعات مورفولوژی/ سیتوشیمی جهت تشخیص انواع مختلف لوسمی حاد انجام شده است.

روش کار:

www.SID.ir

Archive of SID

آسپیراسیون مغز استخوان در شیشه حاوی EDTA به آزمایشگاه ارسال و حد اکثر ظرف ۶ ساعت پس از نمونه برداری مورد آزمایش قرار میگرفت.هر نمونه آسپیراسیون مغز استخوان پس از رنگ آمیزی رایت مورد مطالعه قرار گرفته و سپس دیگر رنگ‌آمیزی‌های سیتوشیمی(PAS، استراز اختصاصی و غیر اختصاصی، سودان بلاک و هیدروپراکسیداز) بر حسب نیاز انجام شده است.

در انتها بر اساس یافته‌های مورفولوژی/ سیتوشیمی پانلی از آنتی بادی تک دودمانی تهیه شده از شرکت DAKO برای آزمایش روی سلول‌های بلاست انتخاب شد. مارکرهای تعیین کننده پیش آگهی، همچنین مارکرهایی که به طور طبیعی با رده خاص سلولی همراهی ندارد، جهت تشخیص لوسمی‌های mixed lineage , Biphenotypic مورد استفاده قرار گرفت. مارکرهای فنوتایپ تشخیصی برای AML، CD11، CD 13، CD33، CD14، CD15 و cMPO در نظر گرفته شد.

همچنین مارکرهای ایمونوفنوتایپ برای انواع ALL بصورت زیر است:

در B-Precursor Tdt,DR,CD34,CD19,CD10 و در Pre-B SIgM, B-Cell در ; cytolasmicμchain ,CD10,CD19 ,DR CD20,CD22, و در T-cell CD4,CD8 CD3,CD5,CD7 , CD1,CD2 تعیین شد.

برای انجام فلوسیتومتری آنتی‌بادی تک دودمانی مناسب به نمونه آسپیراسیون مغز استخوان حاوی مواد آنتی کواگولانت اضافه و توسط دستگاه Q-Prep فرآوری شد. سپس نمونه‌ها توسط فلوسیتومتر شرکت کولتر مدل Profile آنالیز شدند. در انتها تمام نتایج و اطلاعات بررسی شدند.

لازم به ذکر است که قبل از انجام مطالعه بطور گسترده، جهت بررسی خطای فردی، درجه همخوانی ما بین دو پاتولوژیست مجری طرح، در مورد ۴۰ بیمار صورت گرفت که ۹۳٪ بود. سپس طرح بطور گسترده انجام شد.

یافته‌ها:

در این مطالعه ۴۲۰ بیمار مبتلا به لوسمی حاد مورد بررسی قرار گرفتند که انواع آنها بر اساس ایمونوفنوتایپ به شرح زیر است:

۲۸۰ مورد(۶۶،۷٪) لوسمی‌لنفوبلاستیک حاد، ۱۳۵ مورد(۳۲،۱٪) لوسمی میلوئید حاد، ۳ مورد(۰،۷٪) biphenotypic و۲ مورد (۰،۵٪) لوسمی unclassified .

جدول ۱ – انواع لوسمی حاد لنفوبلاستیک بر اساس مارکرهای ایمونوفنوتایپ

رده سلولی ALL	تعداد	درصد
B	۱۳	٤/٦
Pre-B	۱۲۹	٤٦/۱
B-Precursor	۹۲	۳۲/۹
T	٤٦	۱٦/٤
جمع	۲۸۰	۱۰۰

با استفاده از فلوسیتومتری رده سلولی انواع لوسمی حاد لنفوبلاستیک مشخص شد که در جدول شماره(۱) نمایش داده شده است.

پس از تشخیص لوسمی میلوئید توسط فلوسیتومتری انواع لوسمی حاد میلوئید بر اساس معیارهای FAB گروه بندی شد که در جدول(۲) نشان داده شده است.

جدول ۲ – انواع لوسمی حاد میلوئید بر اساس تقسیم‌بندی FAB

انواع AML	تعداد	درصد
M0	۱۳	۹/٦
M1	۳۰	۲۲/۲
M2	۱۳	۹/٦
M3	۲۰	۱٤/۸
M4	۳۰	۲۲/۲
M5	۲۵	۱۸/۵
M6	٤	۳
جمع	۱۳۵	۱۰۰

جدول ۳ – حساسیت تشخیصی متد FAB برای تشخیص لوسمی حاد میلوئید در مقابل ایمونوفنوتایپ بعنوان تست gold standard

FAB / FLOW	AML +	AML –	جمع
AML +	۱۱۵	۲۰	۱۳۵
AML –	۲۳	۲٦۲	۲۸۵
جمع	۱۳۸	۲۸۲	۴۲۰

Sensitivity= %۸۵, Specificity= %۹۲, Positive predictive value= %۸۳, Negative predictive value=%۹۳

جدول ۴– حساسیت تشخیصی متد FAB برای تشخیص لوسمی حاد لنفوئید در مقابل ایمونوفنوتایپ بعنوان تست gold standard

FAB	ALL	جمع

www.SID.ir

Archive of SID

FLOW	+	−	
ALL +	۲۵۷	۲۳	۲۸۰
ALL −	۲۵	۱۱۵	۱۴۰
جمع	۲۸۲	۱۳۸	۴۲۰

Sensitivity=%۹۱, Specificity=٪۸۲, Positive predictive value=٪۹۱, Negative predictive value=٪۸۳

حساسیت مورفولوژی/ سیتوشیمی جهت تشخیص لوسمی میلوئید (AML) ۸۵٪ و جهت تشخیص لوسمی لنفوبلاستیک حاد(ALL) ۹۱٪ بوده است جدول(۴ و۳). موارد عدم تشخیص صحیح در مورد ALL، گزارش AML در تقسیم بندی FAB داشتند و در موارد عدم تشخیص AML بالعکس.

۳ مورد بیمار لوسمی biphenotypic و ۲ مورد بیمار لوسمی unclassified براساس مورفولوژی/ سیتوشیمی بعنوان موارد ALL گزارش تشخیص داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری:

لوسمی حاد گروه ناهمگونی از بدخیمی‌ها با تظاهرات بالینی مورفولوژیک، ایمونولوژیک و مولکولی گوناگون میباشد. بدلیل رژیم‌های درمانی متفاوت در لوسمی حاد(میلوئید در مقابل لنفوئید، نوع ALL سلول B بالغ در مقابل بقیه انواع ALL) تعیین ایمونوفنوتایپ در درمان بیماری کمک شایانی نموده است(۵).

عدم توانایی سیستم FAB در تشخیص انواع خاصی از لوسمی‌ها (M0,M7,M3V) و نیز در تعیین رده سلولی ALL، استفاده از فلوسیتومتری را الزامی می‌کند(۶).

از سوی دیگر ایمونوفنوتایپ قادر است با تعیین مارکرهای سلولی پیش آگهی بیماری را نیز تا حدودی تعیین نماید(۷). در مطالعه حاضر حساسیت تشخیصی روش مورفولوژی/ سیتوشیمی برای لوسمی لنفوبلاستیک حاد ۹۱٪ و جهت تشخیص لوسمی میلوئید حاد ۸۵٪ بوده است. ویژگی تشخیصی آن به ترتیب ۸۲٪ برای ALL و ۹۲٪ برای AML می‌باشد.

عدم تطابق بین نتایج این دو روش به دلیل ناتوانائی مورفولوژی/ سیتوشیمی در تشخیص انواع لوسمی حاد می‌باشد، این چنین عدم تطابق تشخیصی در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است.

در مطالعه Kheiri و همکاران تطابق تشخیص مورفولوژی/ سیتوشیمی با فلوسیتومتری برای رده میلوئید ۸۹/۲٪ و برای رده لنفوئید ۸۰٪ بوده است(۸).

در مطالعه Mhawech و همکاران توانائی مورفولوژی/ سیتوشیمی در تشخیص لوسمی حاد ۸۱/۲٪ بوده است(۹).

درمطالعه‌ای در عربستان سعودی، مورفوسیتوشیمی در۸۴/۲٪ با مارکرهای فنوتیپی همخوانی داشت(۱۰).

عدم تطابق بین این دو روش در مطالعه حاضر و مطالعات مشابه در کشورهای دیگر لزوم استفاده از فلوسیتومتری در کنار مورفولوژی/ سیتوشیمی جهت تشخیص دقیق و قطعی لوسمی حاد و انواع آن و انتخاب مناسب‌ترین رژیم درمانی را بیان میدارد.

با انتخاب بهترین پروتکل درمانی بر اساس تشخیص صحیح، بیمار سریع تر و بهتر به درمان جواب میدهد و این تشخیص با بکارگیری مورفولوژی/ سیتوشیمی و ایمونوفنوتایپ بدست می‌آید.

تشکر و قدردانی:

در انتها از استاد ارجمند آقای دکتر آزردگان که نویسندگان این مقاله را در امور آماری مربوطه راهنمائی نمودند صمیمانه تشکر می‌کنیم. همچنین بر خود لازم می‌دانیم که از همکاریهای بیدریغ پرسنل محترم بخش فلوسیتومتری بیمارستان بقیه‌الله الأعظم(عج)، سرکار خانم‌ها حقیقی، همتی و گل‌محمدی تشکر و قدردانی نمائیم.

References:

1- Ball ED, Fanger MW. The expression of myeloid-specific antigens on myeloid leukemia cells:correlation with leukemia subclasses and implication for normal myeloid differentiation. Blood 1983; 61, 456.
2- Jennings D, Foon KA. Recent advances in flow cytometry:application to the diagnosis of hematologic malignancy. blood 1997; 90(8): 2863-92.
3- Khalidi HS, Medeiros J. Immunophenotype of adult acute myeloid leukemia. Am J Clin Pathol 1998; 109(2): 211-20.
4- Wan J, Beauregard P. Monoclonal antibodies in the management of acute leukemia. Am J Hematol 1995; 50, 188-99.
5- Weir EG, Borowitz MJ. Flowcytometry in the diagnosis of acute leukemia. Semin Hematol 2001; 38(2): 124-38.
6- Fauci A: Harrison's Principles of Internal Medicine. 14th ed. USA: Mc Graw Hill; 1998: 707.
7- Khalidi HS, Chang KL. Acute lymphoblastic

www.SID.ir

Archive of SID

leukemia:survey of immunophenotype:FAB classification. Frequency of myeloid Antigen expression and karyotypic abnormalities in 210 pediatric and adult cases. Am J Clin Pathol 1991; 111, 467-76.

8- Kheiri SA, Mackarrell T. Flowcytometry with or without cytochemistry for the diagnosis of acute leukemia.Am J Clin Pathol 1998; 15; 34(2):82-6.

9- Mhawech P, Buffone GJ. Cytochemical staining and flowcytometry methods applied to the diagnosis of acute leukemia in the pediatric population:an assessment of relative usefulness. J Pediatr Hemtol Oncol 2001; 23(2): 89-92.

10- Khalil SH. Immunophenotyping of acute leukemia at King Faisal specialist hospital and research center. Ann Saudi Med 1995; 15(2): 137-9.

[1]۱- دکترای ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- گواهی عالی بهداشت، اداره کل پیشگیری و مبارزه با بیماریها

www.SID.ir