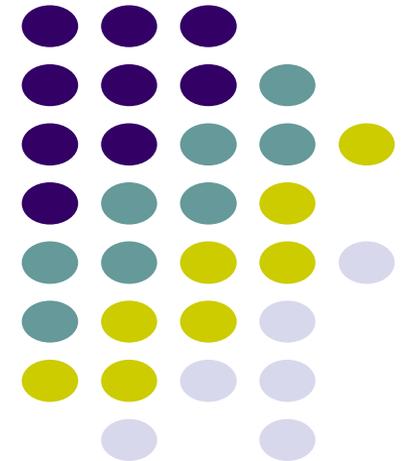


# 10. Citofluorimetria Anticorpi monoclonali

**Prof. Gian Matteo Rigolin**  
**Ematologia**  
**Azienda Ospedaliero Universitaria**  
**Arcispedale S. Anna Ferrara**



# Anticorpi monoclonali



- I progressi della FCM non sarebbero possibili senza lo sviluppo degli anticorpi monoclonali.
- Anticorpi monoclonali: anticorpi identici fra loro in grado di legare specificamente un determinato antigene.
- Esistono centinaia di diversi anticorpi monoclonali

# Anticorpi Monoclonali



- La prima serie di analisi comparative degli anticorpi è stata eseguita durante il primo seminario sull'antigene di differenziazione dei leucociti umani (HLDA) 1982 a Parigi, Francia.
- L'analisi statistica dei dati di diversi laboratori ha identificato i cosiddetti "**cluster di differenziazione (CD)**", chiamati per la procedura statistica di analisi dei cluster e per l'attenzione sulla differenziazione dei leucociti.

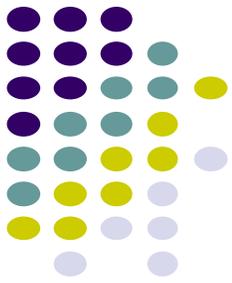
# Anticorpi Monoclonali



- È stata istituita un'organizzazione chiamata Consiglio per l'antigene della differenziazione dei leucociti umani e nove seminari HLDA successivi hanno caratterizzato 350 antigeni CD.
- Il consiglio HLDA ha rivisto e modificato gli obiettivi di HLDA nel 2004 e ha cambiato il nome dell'organizzazione in Human Cell Differentiation Molecules (HCDM).
- Il consiglio HCDM mantiene un database completo di molecole di CD ([www.hcdm.org](http://www.hcdm.org)).

LIST OF CD ANTIGENS MOST COMMONLY USED IN FLOW CYTOMETRY IMMUNOPHENOTYPING OF HEMATOLOGIC SAMPLES

CD	Expression in Normal Hematopoietic Cell Types	MW (kD)	Function
CD1a	Cortical thymocytes, Langerhans cells, dendritic cells	49	Antigen presentation, w/ $\beta$ 2m
CD2	Thymocytes, T-cells, NK cells	50	CD58 ligand, adhesion, T-cell activation
CD3	T-cells, thymocyte subset		w/TCR, TCR surface expression/signal transduction
CD4	Thymocyte subset, T-cell subset, monocytes, macrophages	55	MHC class II coreceptor, HIV receptor, T-cell differentiation/activation
CD5	Thymocytes, T-cells, B-cell subset	67	CD72 receptor, TCR or BCR signaling, T-B interaction
CD7	Thymocytes, T-cells, NK cells, small subset of hematopoietic progenitors	40	T costimulation
CD8	Thymocyte subset, T-cell subset, NK subset	32–34	MHC class I coreceptor, receptor for some mutated HIV-1, T-cell differentiation/activation
CD9	Eosinophils, basophils, platelets, activated T-cells	22–27	Cellular adhesion and migration
CD10	B-precursors, germinal center B-cells, thymocyte subset, neutrophils	100	Zinc-binding metalloproteinase, B-cell development
CD11a	Lymphocyte subsets, granulocytes, monocytes, macrophages	180	CD11a/CD18 receptor for ICAM-1, -2, -3, intercellular adhesion, T costimulation
CD11b	Granulopoietic cells, NK cells	170	Binds CD54, ECM, and iC3b
CD11c	Dendritic cells, granulopoietic cells, NK cells, and B-cell and T-cell subsets	150	Binds CD54, fibrinogen, and iC3b
CD13	Granulopoietic cells, monocytes	150–170	Zinc-binding metalloproteinase, antigen processing, receptor for corona virus strains
CD14	Monocytes, macrophages, Langerhans cells	53–55	Receptor for LPS/LBP, LPS recognition
CD15	Neutrophils, eosinophils, monocytes		Adhesion
CD16	Neutrophils, macrophages, NK cells	50–65	Component of low-affinity Fc receptor, phagocytosis, and ADCC
CD19	B-cells, plasma cells	95	Complex w/CD21 and CD81, BCR coreceptor, B-cell activation/differentiation
CD20	B-cells	33–37	B-cell activation
CD21	B-cells and T-cells subsets	145, 110	Complement C3d and EBV receptor, complex w/CD19 and CD81, BCR coreceptor
CD22	B-cells	150	Adhesion, B-mono, B-T interactions
CD23	B-cells, eosinophils, platelets	45	CD19-CD21-CD81 receptor, IgE low-affinity receptor, signal transduction
CD24	Thymocytes, erythrocytes, lymphocytes, myeloid cells	35–45	Binds P-selectin
CD25	Activated B-cells and T-cells	55	IL-2R $\alpha$ , w/IL-2R $\beta$ , and $\gamma$ to form high affinity complex
CD33	Granulopoietic cells, monocytes, dendritic cells	67	Adhesion
CD34	Hematopoietic precursors	105–120	Stem cell marker, adhesion, CD62L receptor
CD36	Platelets, monocytes, erythropoietic precursors	88	ECM receptor, adhesion, phagocytosis
CD38	High expression on B-cell precursors, plasma cells and activated T-cells, low on granulopoietic cells	45	Ecto-ADP-ribosyl cyclase, cell activation
CD41	Platelets, megakaryocytes	125/22	w/CD61 forms GPIIb, binds fibrinogen, fibronectin, vWF, thrombospondin, platelet activation and aggregation
CD42a	Platelets, megakaryocytes	22	Complex w/CD42b, c and d, receptor for vWF and thrombin, platelet adhesion to subendothelial matrices
CD45	Hematopoietic cells, multiple isoforms from alternative splicing	180–240	Tyrosine phosphatase, enhanced TCR and BCR signals
CD56	NK subset, T-cell subset	CD175–185	Neural cell adhesion molecule
CD57	NK subset, T-cell subset	110	HNK-1
CD59	Ubiquitous	18–20	Complement regulatory protein
CD61	Platelets, megakaryocytes	105	Integrin $\beta$ 3, adhesion, CD41/CD61 or CD51/CD61 mediate adhesion to ECM
CD62L	B-cells, T-cells subsets, monocytes, granulocytes, NK-cells, thymocytes	74, 95	CD34, GlyCAM, and MAdCAM-1 receptor, leukocyte homing, tethering, rolling
CD64	Monocytes, neutrophils	72	FC $\gamma$ RI, increases on neutrophils in sepsis
CD65	Granulopoietic cells		Phagocytosis
CD66	Neutrophils	90	Cell adhesion
CD68	Monocytes, neutrophils, basophils, mast cells,	110	Macrosialin





CD	Expression in Normal Hematopoietic Cell Types	MW (kD)	Function
CD71	Proliferating cells, erythroid precursors, reticulocytes	95	Transferrin receptor, iron uptake
CD79	B-cells, plasma cells	33–37	Component of BCR, BCR surface expression and signal transduction
CD103	B- and T-cell subsets	150, 25	w/integrin $\beta 7$ , binds E-cadherin, lymph homing/retention
CD117	Hematopoietic progenitors, mast cells	145	Stem cell factor receptor, hematopoietic progenitor development/differentiation
CD123	Basophils, dendritic cell subset, hematopoietic progenitors	70	IL-3R $\alpha$ , w/CDw131
CD133	Hematopoietic stem cells subset	120	
CD159c	NK	40	w/MHC class I HLA-E molecules, forms heterodimer with CD94
CD235a	Erythropoietic precursors	36	Glycophorin A



# Pannello di MoAb e Fluorocromi

- La selezione del pannello di MoAb dovrebbe basarsi sul tipo di campione tenendo conto delle informazioni fornite dall'anamnesi clinica, dall'indicazione medica e dalla morfologia.
- Sono state pubblicate diverse linee guida e documenti di consenso che forniscono elenchi di antigeni proposti per la diagnosi di neoplasie ematologiche.



# Pannello di MoAb e Fluorocromi

- La selezione delle combinazioni di anticorpi che meglio delineano, distinguono e misurano le differenze chiave all'interno delle popolazioni target di interesse e il numero di anticorpi misurati contemporaneamente è un passaggio fondamentale per i test FCM.
- La scelta del **fluorocromo** coniugato può influire sullo fluorescenza di fondo, sulla specificità e sulla gamma dinamica di misurazione.



# Pannello di MoAb e Fluorocromi

- Tipicamente, si sceglie un fluorocromo con la migliore efficienza / resa quantica inteso come coniugato anticorpale per identificare la più bassa densità di antigene in modo da ottenere il miglior rapporto segnale-rumore possibile.
- È estremamente importante distinguere in modo affidabile tra le popolazioni di cellule antigene-positive e antigene-negative al fine di misurare accuratamente la popolazione di cellule positive.
- Quest è particolarmente importante nelle popolazioni di cellule che esprimono debolmente gli antigeni.



# Pannello di MoAb e Fluorocromi

- I controlli Florescence-minus-one (FMO) forniscono la massima fluorescenza prevista per una determinata popolazione in un determinato canale quando il reagente utilizzato in quel canale viene omesso.
- Questi controlli includono sia **l'autofluorescenza** delle cellule sia lo **spillover** che possono essere presenti anche dopo correzioni di compensazione e quindi tali controlli sono più adatti per determinare i confini tra cellule positive e negative per ciascun sottoinsieme.



# Pannello di MoAb e Fluorocromi

- Spesso in ogni tubo/provetta vengono utilizzati gli stessi anticorpi di gating di ancoraggio, consentendo in tal modo strategie coerenti di gating/analisi della popolazione in tutti i tubi di un pannello.
- Nell'immunofenotipizzazione dei sottogruppi di linfociti e nella diagnosi di leucemia / linfoma, è stato dimostrato che **il gate di ancoraggio CD45** fornisce un'identificazione differenziale della popolazione correlata alle differenze morfologiche al microscopio

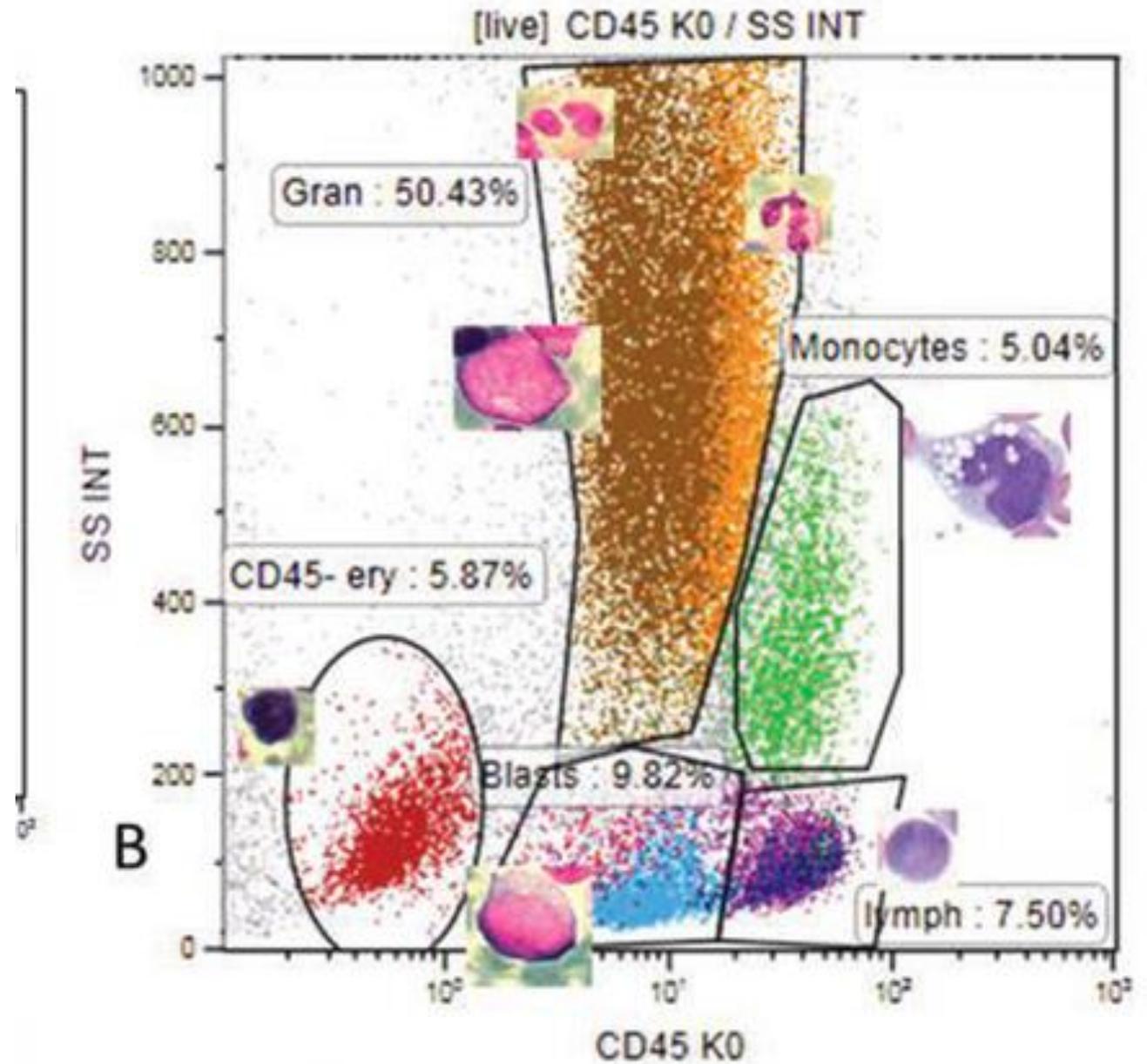


# Pannello di MoAb e Fluorocromi

## Espressione del CD45 e SSC

- I linfociti maturi sono caratterizzati da basso SSC e forte espressione di CD45.
- I monociti hanno SSC più elevato e forte espressione di CD45.
- I precursori eritropoietici sono CD45 negativi e hanno SSC basso.
- Precursori e granulociti granulopoietici sono debolmente positivi CD45 e hanno SSC alto.
- I precursori ematopoietici precoci di varie linee, tra cui le cellule staminali CD34 +, sono caratterizzati da bassa espressione di CD45 e basso SSC.

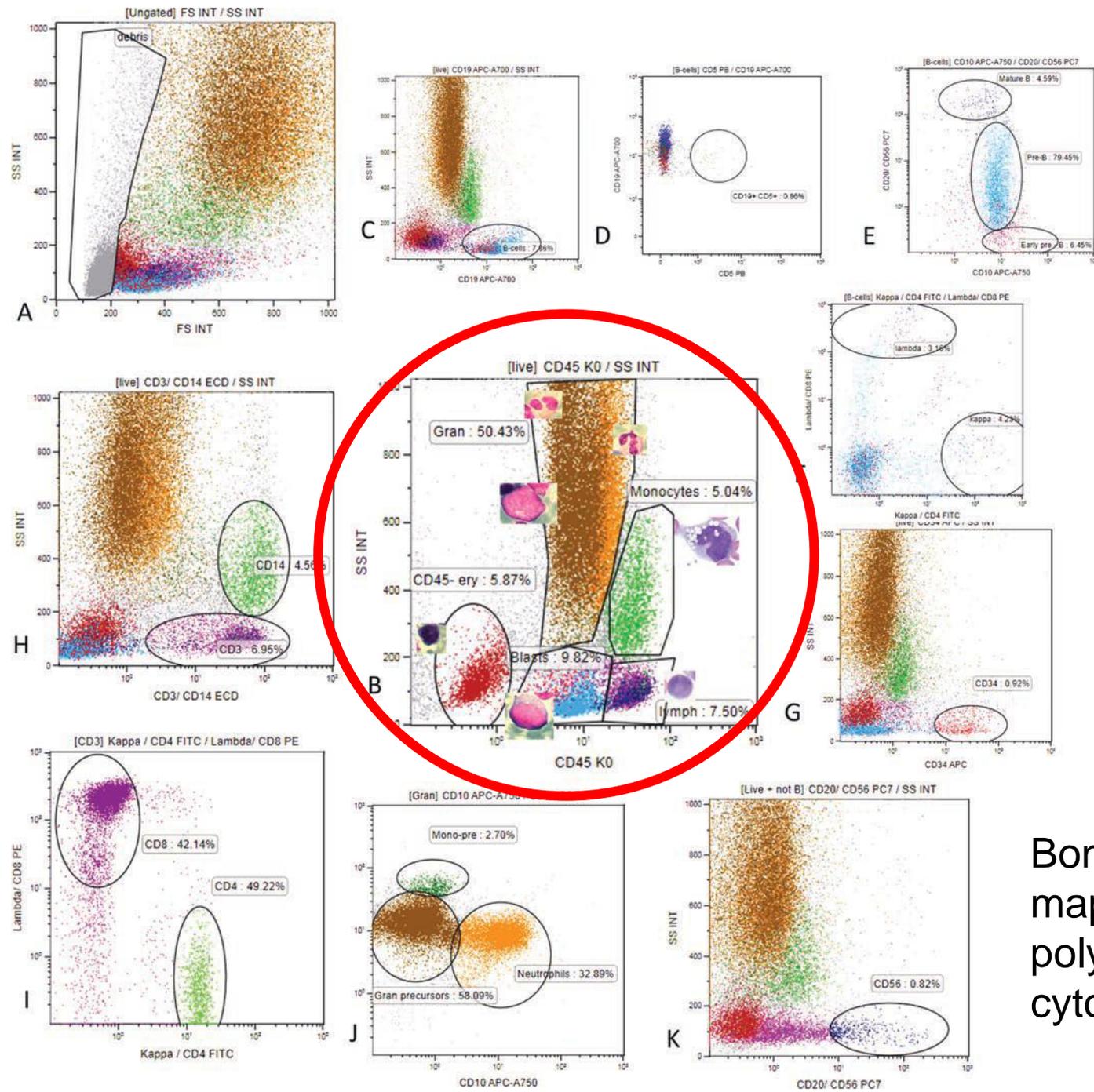
# CD45 anchor gating



# Pannello di MoAb e Fluorocromi

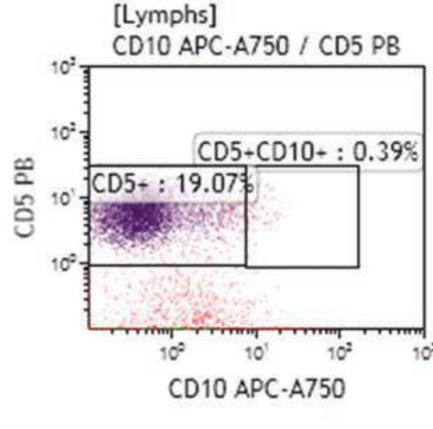
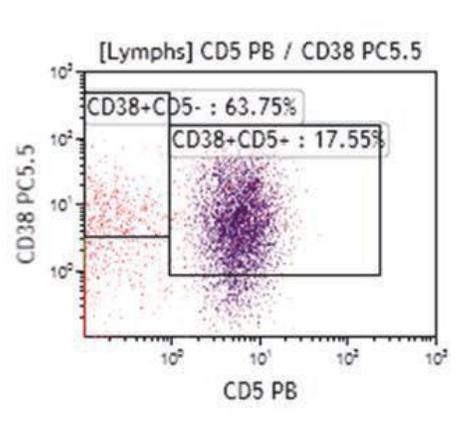
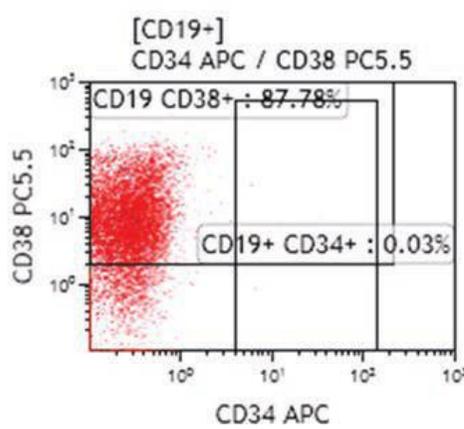
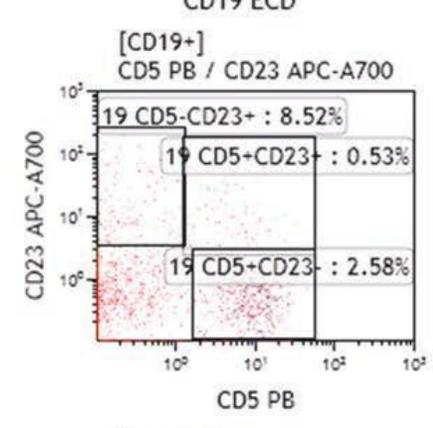
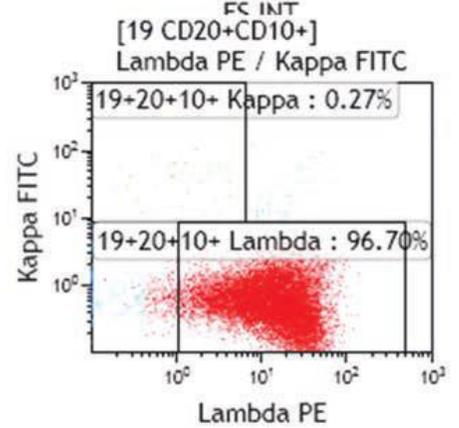
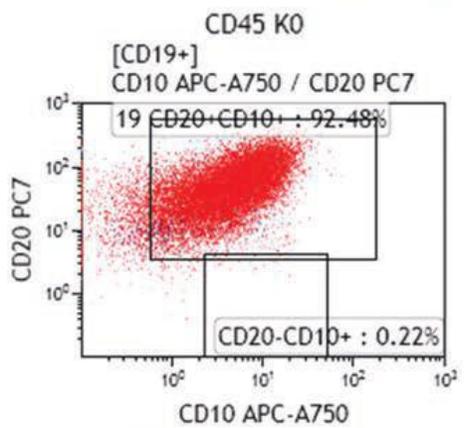
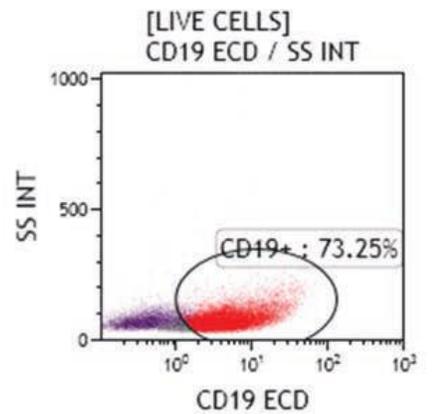
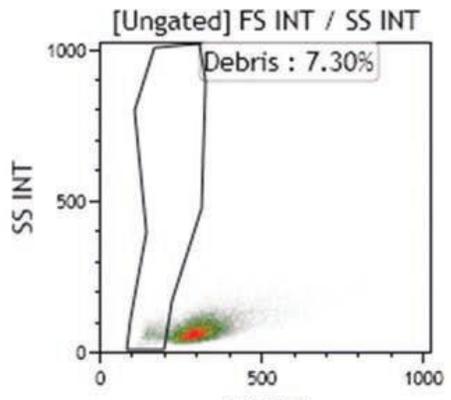
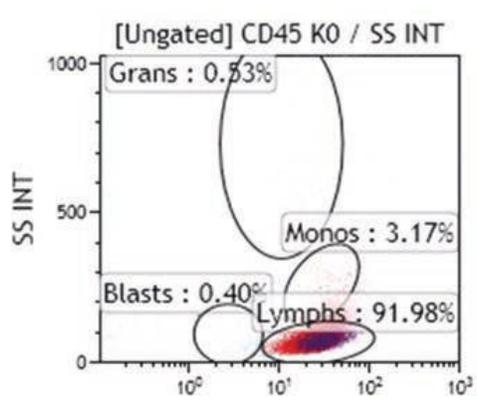
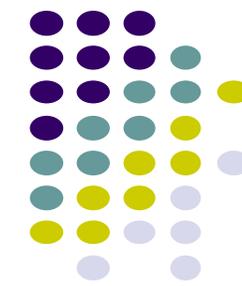


- La localizzazione di queste sottopopolazioni sul diagramma CD45/SSC può essere confermata dalla colorazione multicolore di vari antigeni associati a quelli di una specifica linea cellulare insieme a CD45

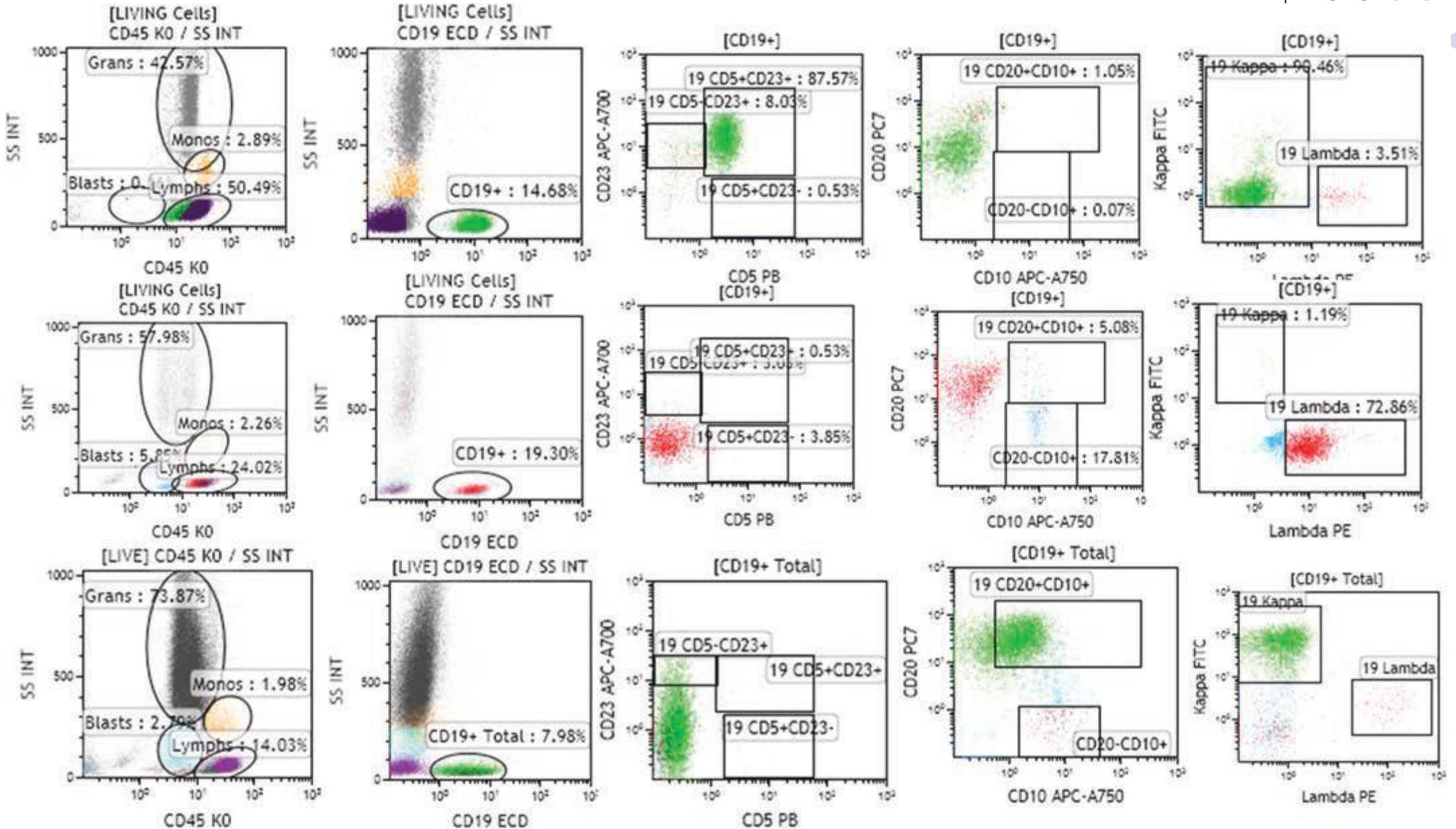


Bone marrow mapping with polychromatic flow cytometry.

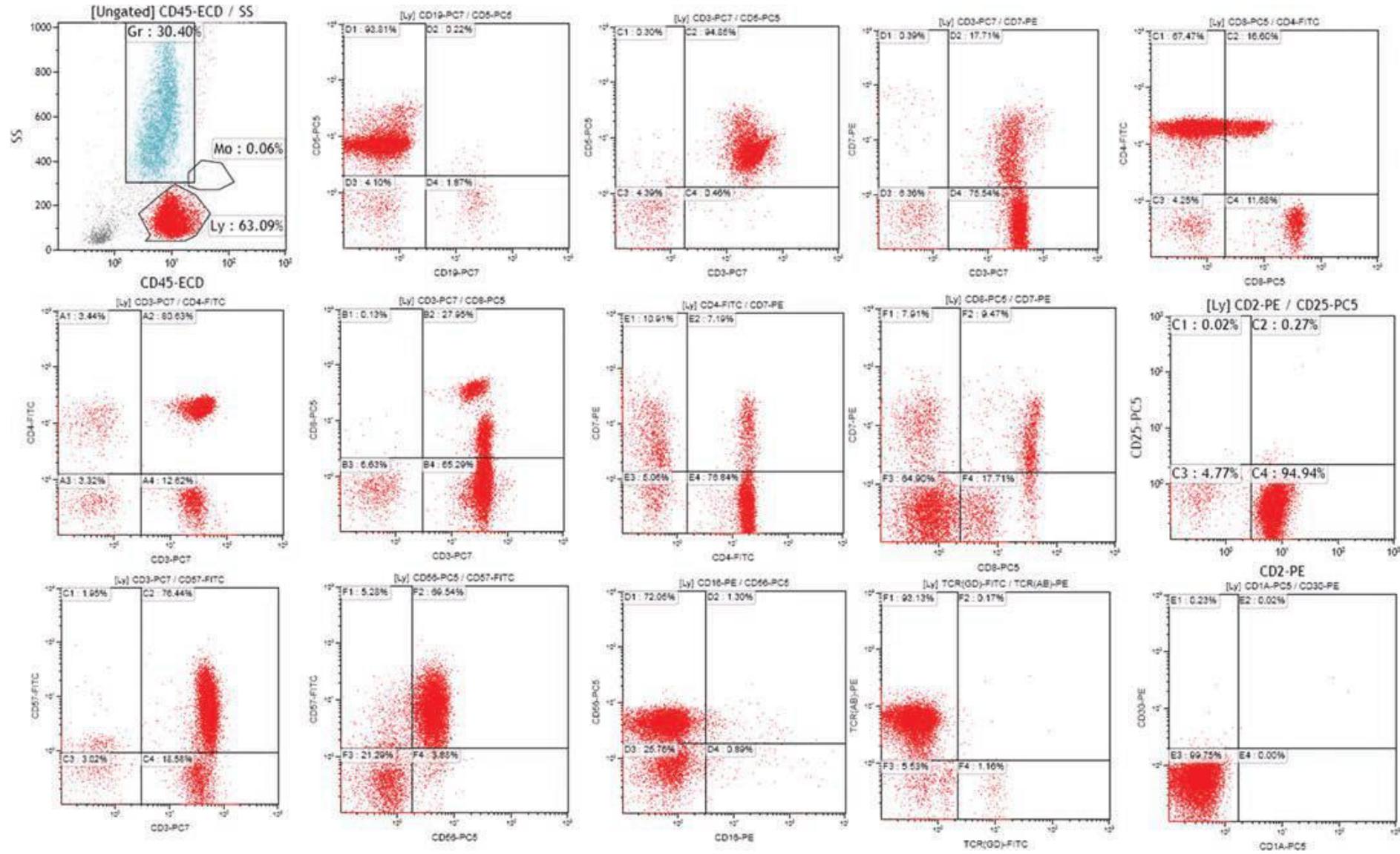
# Examples of analysis of B-cell compartment in bone marrow samples.



# Examples of analysis of B-cell compartment in bone marrow samples



# Example of aberrant T-cell population detected in peripheral blood of a patient with lymphocytosis





# Preparazione del campione

## Tipologie di campioni appropriati per FCM clinica

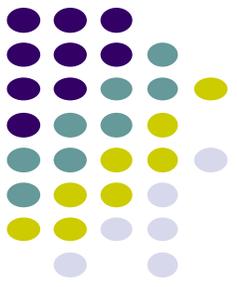
- sangue periferico (PB),
  - aspirato di midollo osseo (BM),
  - tessuto disaggregato incluso linfonodo (LN) e altre biopsie dei tessuti molli
  - aspirazioni di aghi sottili (FNA)
  - Biopsie core BM,
  - liquido cerebrospinale (CSF),
  - altri fluidi corporei inclusi effusioni e fluidi di lavaggio, e
  - nuclei di tessuto incorporato in paraffina per saggi di ploidia del DNA.
- 
- **Ad eccezione di questi ultimi, tutti i campioni clinici di FCM devono essere considerati a rischio biologico ed etichettati come tali in conformità con gli standard di sicurezza.**



# Preparazione del campione

- Un modulo di richiesta dell'analisi, sia esso stampato o elettronico, deve accompagnare tutti i campioni.
- Questo modulo dovrebbe includere identificativi univoci del paziente, età, sesso, diagnosi (se precedentemente stabiliti) o condizioni sospette in esame, nome del medico che ha presentato il campione, farmaci pertinenti o trattamenti recenti (comprese le date di chemioterapia o radioterapia), data e ora di raccolta del campione e fonte del campione (ad es. aspirato di midollo osseo, liquido cerebrospinale, ecc.).
- Il test richiesto dovrebbe apparire sull'etichetta del campione o sulla richiesta che accompagna il campione.
- Emocromo completo (CBC) deve essere fornito per i campioni PB e BM.

# Preparazione del campione



- Per PB, possono essere usati acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), eparina sodica o destrosio citrato acido (ACD).
- Per gli aspirati BM, l'eparina sodica è l'anticoagulante preferito ed è necessario se si devono eseguire test citogenetici sullo stesso campione.
- Tutte le biopsie tissutali destinate alla valutazione FCM, comprese LN o altre biopsie tissutali, devono essere trasportate in un volume adeguato di un mezzo di trasporto appropriato in un contenitore sterile per ottimizzare la vitalità cellulare.
- I campioni di CSF devono essere stabilizzati o analizzati immediatamente a causa del potenziale effetto tossico sulla vitalità cellulare.



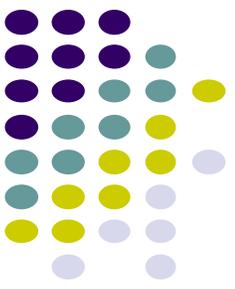
# Preparazione del campione

- Tutti i campioni clinici devono essere analizzati al più presto.
  - Come regola generale, si preferiscono 24 ore ma 48 ore sono considerate il periodo di tempo più lungo accettabile per l'analisi.
  - Se il tempo di trasporto è più lungo, un rapporto di fattibilità è obbligatorio e i risultati devono essere interpretati con cautela.
- Si consiglia la temperatura ambiente (da 18 ° C a 25 ° C) per la conservazione e il trasporto.



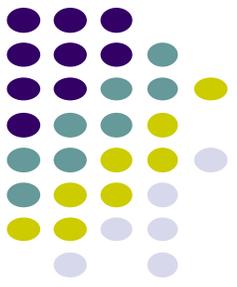
# Preparazione del campione

- Per i campioni che non sono altamente degenerati, le cellule non vitali possono essere escluse dall'analisi mediante il gating FSC contro SSC.
- Le cellule morte intrappolano gli anticorpi coniugati al fluorocromo e aumentano la fluorescenza di fondo.
- Possono anche essere applicati coloranti fluorescenti che legano il DNA che sono esclusi dalle cellule vitali con membrane plasmatiche intatte e quindi positivi nelle cellule non vitali.



# Preparazione del campione

- Per l'immunofenotipizzazione clinica si raccomanda **l'analisi PB/BM completa con lisi eritrocitaria.**
- L'immunofenotipizzazione delle cellule mononucleate separate dal gradiente di densità (Ficoll) **non** deve essere utilizzata a causa della perdita selettiva delle cellule.

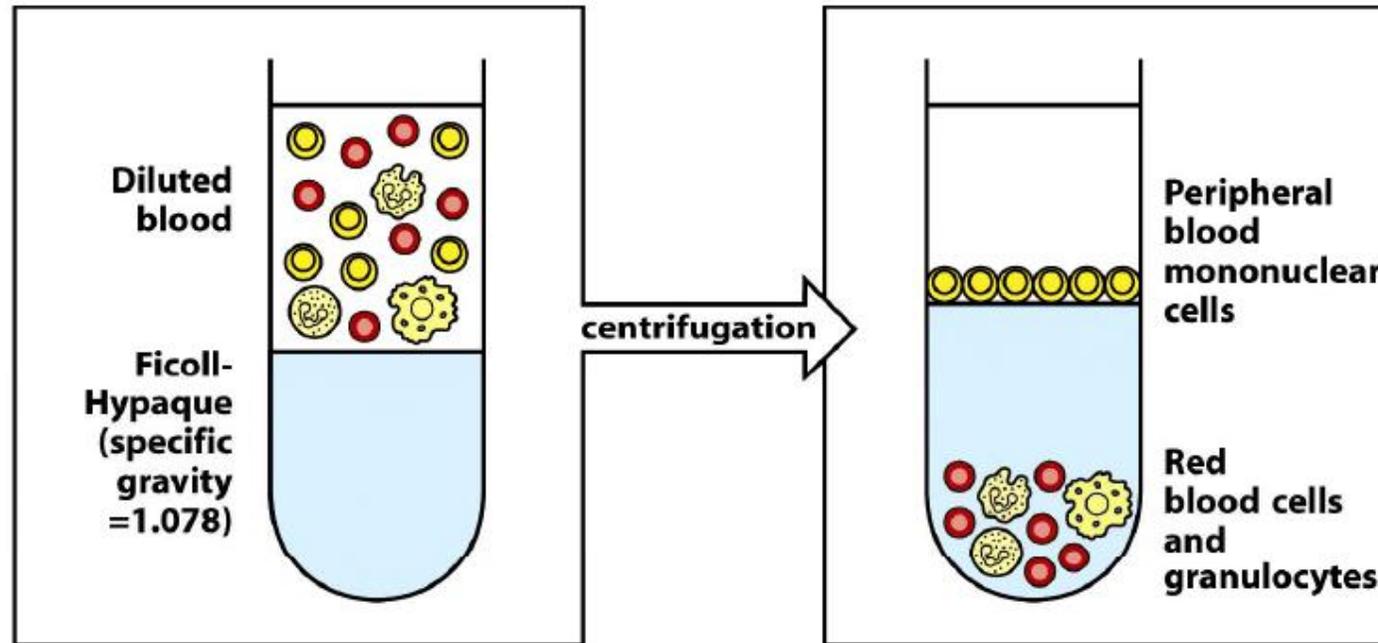


## *Isolation of lymphocytes by Ficoll-Hypaque*

Principle; density gradient centrifugation

Ficoll; carbohydrate polymer, specific gravity=1.078

Usage; to isolate lymphocytes and monocytes from peripheral blood (human/mouse)



*Adapted from KAIST (Shin, EC)*



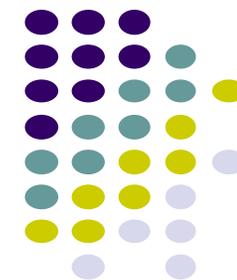
# Preparazione del campione

- Per gli antigeni di superficie, il cosiddetto metodo **“stain-lyse-wash”** offre la migliore discriminazione del segnale.
  - Le cellule vengono prima incubate con quantità appropriate di MAb, quindi gli eritrociti vengono lisati e le cellule vengono infine lavate prima dell'acquisizione.
  - Sono disponibili numerosi reagenti di lisi commerciali, molti dei quali contengono anche un fissativo.
- I campioni per la **determinazione delle sIg** devono essere lavati accuratamente prima dell'incubazione con MAb, al fine di evitare risultati falsi negativi dovuti alla presenza di Ig sieriche.



# Preparazione del campione

- La valutazione di **epitopi intracellulari** richiede generalmente che la cellula sia fissata e permeabilizzata al fine di consentire ai MoAbs o ai coloranti target-binding di attraversare il membrane citoplasmatiche e nucleari.
  - **Kit di fissazione commerciale e permeabilizzazione**, con protocolli raccomandati, sono disponibili da diversi produttori.
- Quando è necessaria la rilevazione simultanea di epitopi superficiali e intracellulari, **la colorazione superficiale viene eseguita per prima**, quindi le cellule vengono fissate e permeabilizzate e infine gli epitopi intracellulari vengono colorati.



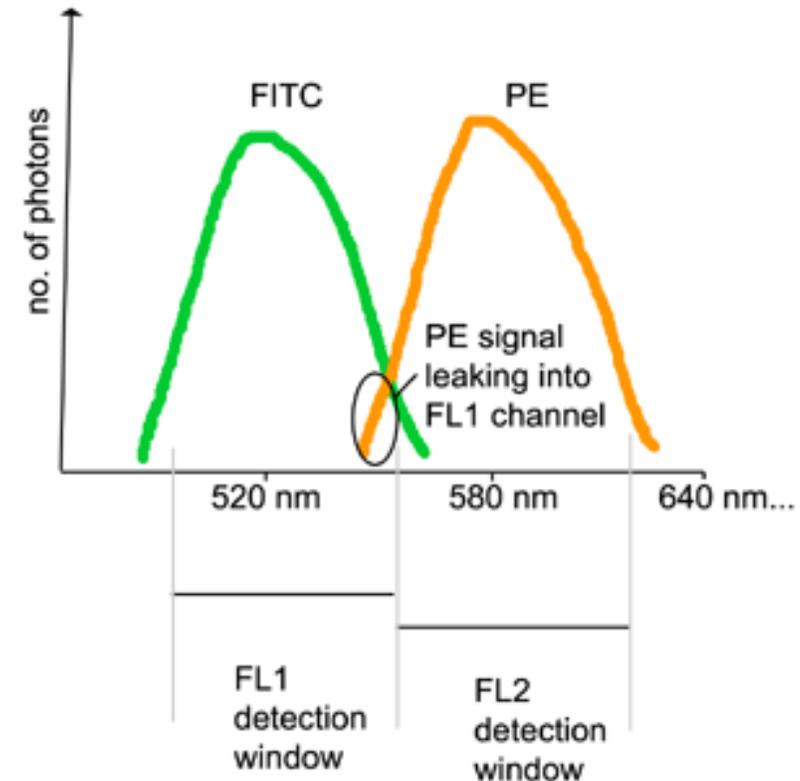
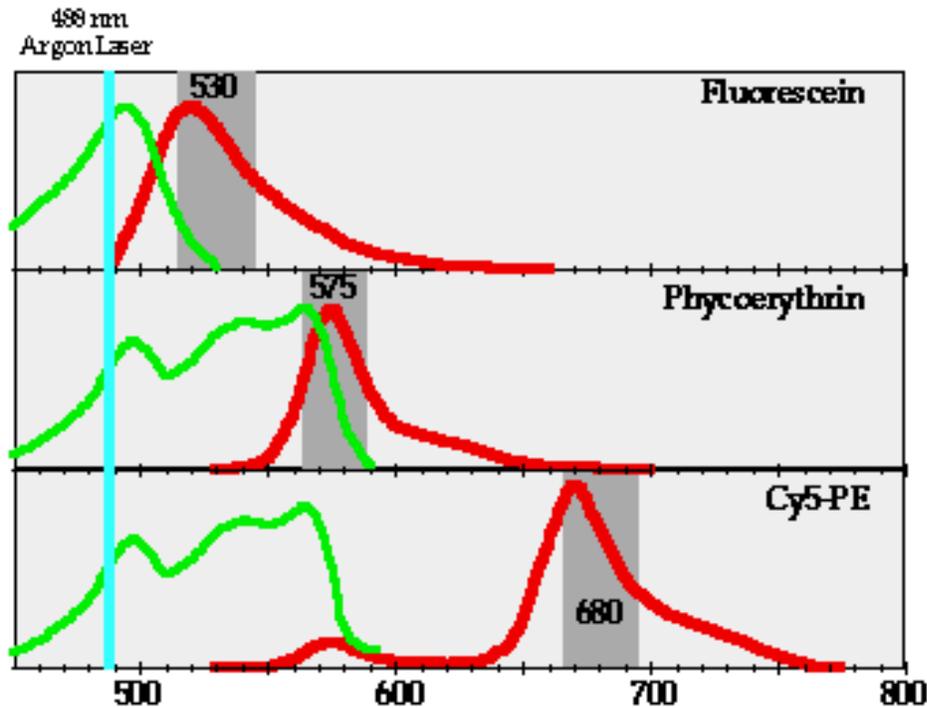
# COMPENSAZIONE

# Compensazione



Una compensazione non corretta è la singola fonte più comune di errore di dati negli esperimenti di citometria a flusso multicolore

La compensazione è il processo di correzione dello “spillover” della fluorescenza.

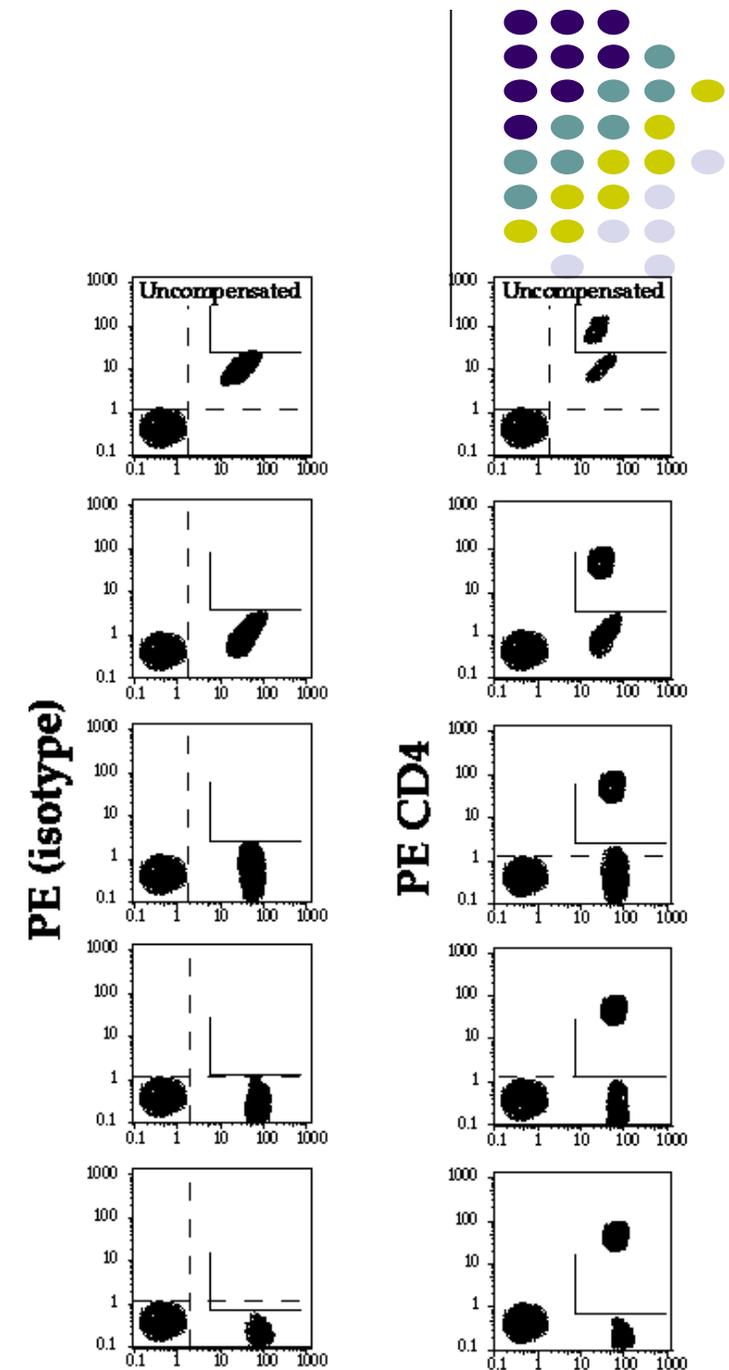


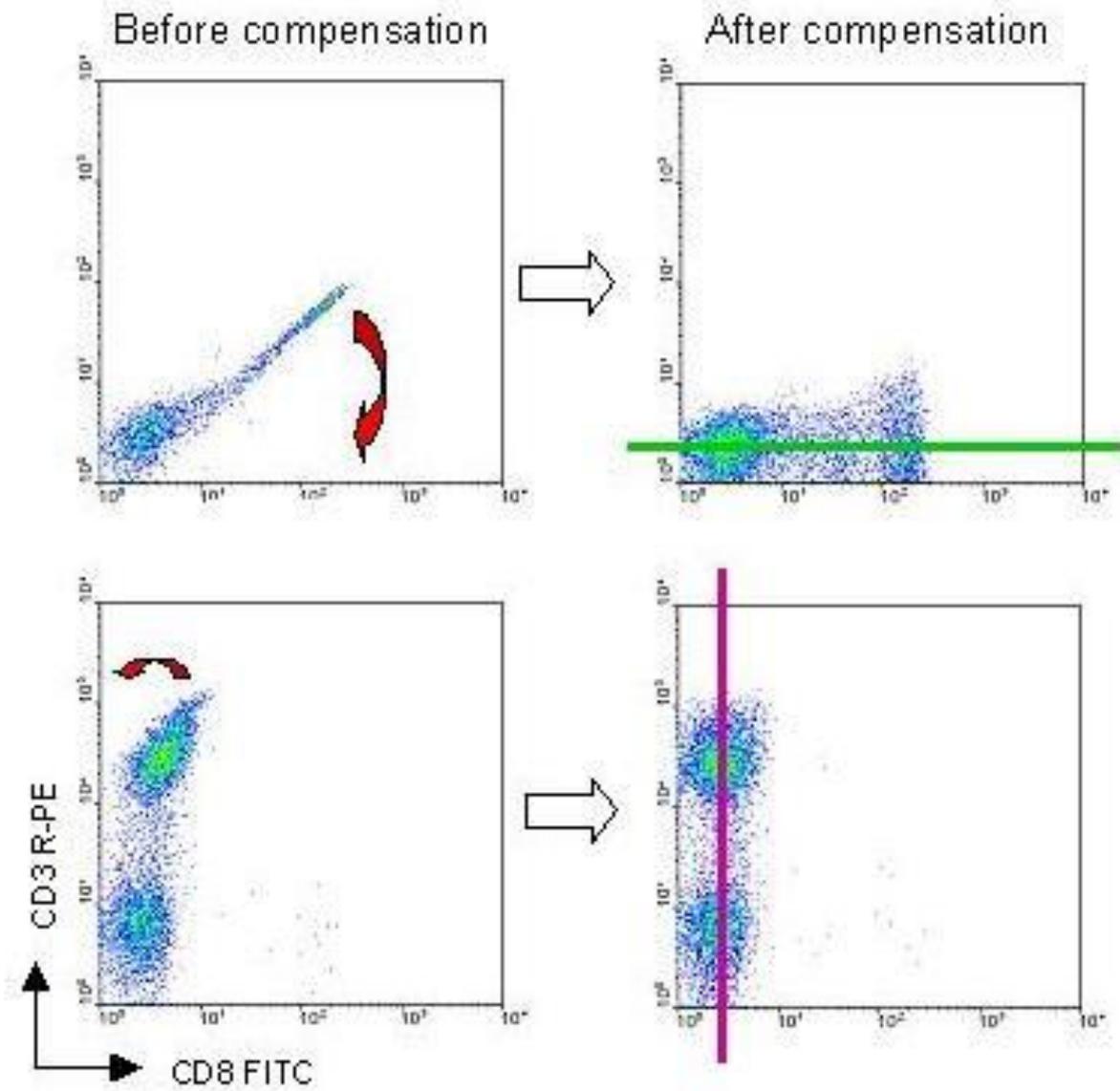
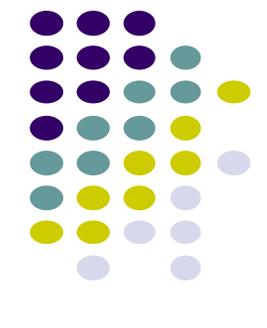
# Importanza della compensazione

è assolutamente necessaria per

1. adeguate misurazioni della densità dell'antigene
2. distinguere le popolazioni deboli da quelle negative: una sottocompensazione comporterà una sovrastima della frequenza delle cellule deboli; un'eccessiva compensazione comporterà una sottovalutazione della frequenza.

*Adapted from [www.drmmr.com/compensation](http://www.drmmr.com/compensation)*





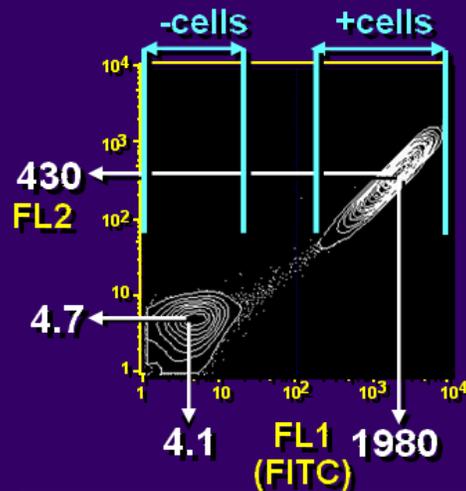
*Adapted from [www.proimmune.com](http://www.proimmune.com)*

*Adapted from [www.drmmr.com/compensation](http://www.drmmr.com/compensation)*

Calculate compensation value



## Principles of Compensation - Calculations



### Calculation of FL1 Spillover into FL2 (FL2 - %FL1)

$$\% = \frac{\text{FL2 Median}^{+cells} - \text{FL2 Median}^{-cells}}{\text{FL1 Median}^{+cells} - \text{FL1 Median}^{-cells}} \times 100$$

$$\% = \frac{430 - 4.7}{1980 - 4.1} \times 100 = 20.3$$



Proper compensation for FL2 is  
achieved when  
 $\text{FL2 Median}^{+cells} = \text{FL2 Median}^{-cells}$



# Principi di FCM



- La maggior parte delle cellule ha un basso numero di molecole fluorescenti native che ne definiscono la **fluorescenza di fondo**.
- Parte della luce può provenire dalla fluorescenza di **spillover** emessa da un reagente misurato in un canale diverso.
- L'interferenza viene corretta applicando la **compensazione** della fluorescenza in base ai dati provenienti da campioni con colorazione singola.
- Questo di solito viene fatto prima o durante la fase di acquisizione dei dati.



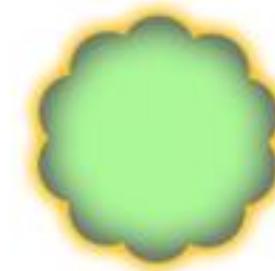
# Principi di FCM

- Il moderno software di analisi dei dati FCM consente anche la raccolta di dati non compensati e l'applicazione di compensazione durante l'analisi.
- Prima dell'acquisizione dei dati, è necessario utilizzare biglie di riferimento standard (microsfere fluorescenti) per regolare le impostazioni della tensione PMT in modo tale che le sfere cadano approssimativamente nella stessa posizione o negli stessi "canali target", predeterminati per ciascun fluorocromo.

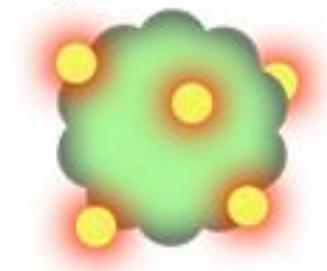
# Coloranti Tandem

- Un tandem è composto da due molecole fluorescenti attaccate covalentemente (una delle quali funge da donatore e l'altra come accettore) che si comporta come un fluoroforo unico con le proprietà di eccitazione del donatore e le proprietà di emissione dell'accettore.
- Ciò è possibile attraverso il fenomeno del trasferimento di energia di risonanza di Förster (FRET), noto anche come trasferimento di energia di risonanza di fluorescenza. Ciò consente a un fluoroforo di passare la sua energia di eccitazione a un fluoroforo vicino, che quindi emette il fotone di luce.
- Questo trasferimento di energia dipende dalla vicinanza e dall'orientamento delle molecole del donatore e dell'accettore.

PE

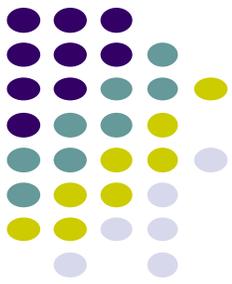


PE/Cy5



**Comparison of PE and PE/Cy5.** Both molecules excite by the blue or green/yellow lasers, based on the excitation properties of PE. While PE emits maximally at 578 nm, PE/Cy5 emits at 667 nm.

PE-Cy5, PE-Cy5.5, PE-Texas Red®, PE-Cy7\*, APC-Cy5.5, APC-Cy7\*



# Citometria a flusso per la diagnosi e il monitoraggio delle neoplasie ematologiche 1/4



- La FCM valuta le singole cellule in sospensione per la presenza e l'assenza di antigeni specifici (fenotipo).
- Vengono effettuate varie misurazioni per :
  1. Identificare le cellule di diverse linee e valutare se siano mature o immature;
  2. Rilevare cellule anormali attraverso l'identificazione dell'espressione di antigeni che differiscono significativamente dalla norma;

# Citometria a flusso per la diagnosi e il monitoraggio delle neoplasie ematologiche 2/4



## 3. Documentare in modo dettagliato

- il fenotipo di popolazioni cellulari anormali (ovvero presenza o assenza di antigeni)
- aumento o riduzione dell'intensità di espressione degli anticorpi marcati con fluorocromo, rispetto alla loro controparte cellulare normale

# Citometria a flusso per la diagnosi e il monitoraggio delle neoplasie ematologiche 3/4



4. Valutare se le informazioni disponibili siano diagnostiche di un'entità distinta della malattia e,
  - in caso contrario, elencare possibili suggerimenti di ulteriori studi che potrebbero essere di valore diagnostico come
    - immunoistochimica,
    - citogenetica convenzionale,
    - FISH,
    - studi molecolari;

# Citometria a flusso per la diagnosi e il monitoraggio delle neoplasie ematologiche 4/4



## 5. fornire informazioni immunofenotipiche che potrebbero

- avere un valore prognostico aggiuntivo,
- Identificare target terapeutici



# Flow cytometry testing

- Per le indicazioni mediche identificate dal gruppo Bethesda del 2006, è stato raggiunto il consenso sulle linee cellulari che dovrebbero essere valutate e gli antigeni da includere in una valutazione preliminare.
- Inoltre, sono state formulate raccomandazioni generali sull'approccio utilizzato per valutare questi antigeni mediante citometria a flusso.
- Utilizzando questo approccio, l'immunofenotipizzazione citometrica a flusso dei campioni clinici può fornire uno schermo rapido per le neoplasie ematologiche e svolgere un ruolo chiave nella diagnosi e nella classificazione.

## Linee cellulari da valutare nelle varie condizioni cliniche

Medical indication	Lineage to be evaluated
Anemia	B, T, M, P
Leukopenia	B, T, M, P
Thrombocytopenia	B, T, M, P
Pancytopenia	B, T, M, P
Neutrophilia	M (limited)
Monocytosis	M
Lymphocytosis	B, T
Eosinophilia	T, M
Erythrocytosis	M (limited)
Thrombocytosis	M (limited)
Blasts in blood or marrow	B, T, M
Lymphadenopathy	B, T
Extranodal masses	B, T
Splenomegaly	B, T, M (limited)
Transformation of chronic leukemia— B cell	B
Transformation of chronic leukemia— T or NK cell	T
Staging for non-Hodgkin lymphoma— B cell	B
Staging for non-Hodgkin lymphoma— T/NK cell	T
Skin rash	B, T
Atypical cells in body fluids (CSF, serous, ocular, etc.)	B, T, M (limited)
Monoclonal gammopathy	B, P
Unexplained Plasmacytosis of bone marrow	B, P
Monitoring of Rx response (unknown diagnostic immunophenotype)	
Mature B cell neoplasm	B
Mature T or NK cell neoplasm	T
Acute lymphoid leukemia—B cell	B
Acute lymphoid leukemia—T cell	T
Acute myeloid leukemia	M
MDS/MPD/Overlap Syndrome	M
Plasma cell neoplasm	P

B, B cell; T, T cell; M, myeloid; P, plasma cell.

# Consensus reagents



Table 3  
*Consensus Reagents for Initial Evaluation for Hematopoietic Neoplasia*

Lineage	Primary reagents
B cells	CD5, CD10, CD19, CD20, CD45, Kappa, Lambda
T cells and NK cells	CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD45, CD56
Myelomonocytic cells	CD7, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, CD33, CD34, CD45, CD56, CD117, HLA-DR
Myelomonocytic cells (limited)	CD13, CD33, CD34, CD45
Plasma cells	CD19, CD38, CD45, CD56

Table 4  
*Reagents for Secondary Evaluation of Specific Hematopoietic Cell Lineages*

Lineage	Secondary reagents
B cells	CD9, CD11c, CD15, CD22, cCD22, CD23, CD25, CD13, CD33, CD34, CD38, CD43, CD58, cCD79a, CD79b, CD103, FMC7, Bcl-2, cKappa, cLambda, TdT, Zap-70, cIgM
T cells and NK cells	CD1a, cCD3, CD10, CD16, CD25, CD26, CD30, CD34, CD45RA, CD45RO, CD57, $\alpha\beta$ -TCR, $\gamma\delta$ -TCR, cTIA-1, T-beta chain isoforms, TdT
Myelomonocytic cells	CD2, CD4, CD25, CD36, CD38, CD41, CD61, cCD61, CD64, CD71, cMPO, CD123, CD163, CD235a
Plasma cells	CD10, CD117, CD138, cKappa, cLambda

# Consensus reagents

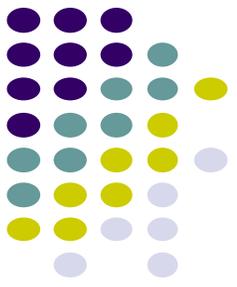


Table 3  
*Consensus Reagents for Initial Evaluation for Hematopoietic Neoplasia*

Lineage	Primary reagents
B cells	CD5, CD10, CD19, CD20, CD45, Kappa, Lambda
T cells and NK cells	CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD45, CD56
Myelomonocytic cells	CD7, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, CD33, CD34, CD45, CD56, CD117, HLA-DR
Myelomonocytic cells (limited)	CD13, CD33, CD34, CD45
Plasma cells	CD19, CD38, CD45, CD56

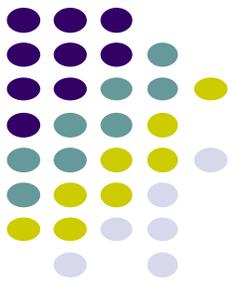
Table 4  
*Reagents for Secondary Evaluation of Specific Hematopoietic Cell Lineages*

Lineage	Secondary reagents
B cells	CD9, CD11c, CD15, CD22, cCD22, CD23, CD25, CD13, CD33, CD34, CD38, CD43, CD58, cCD79a, CD79b, CD103, FMC7, Bcl-2, cKappa, cLambda, TdT, Zap-70, cIgM
T cells and NK cells	CD1a, cCD3, CD10, CD16, CD25, CD26, CD30, CD34, CD45RA, CD45RO, CD57, $\alpha\beta$ -TCR, $\gamma\delta$ -TCR, cTIA-1, T-beta chain isoforms, TdT
Myelomonocytic cells	CD2, CD4, CD25, CD36, CD38, CD41, CD61, cCD61, CD64, CD71, cMPO, CD123, CD163, CD235a
Plasma cells	CD10, CD117, CD138, cKappa, cLambda

## Cell Lineages to be Evaluated for Each Medical Indication

Medical indication	Lineage to be evaluated
Anemia	B, T, M, P
Leukopenia	B, T, M, P
Thrombocytopenia	B, T, M, P
Pancytopenia	B, T, M, P
Neutrophilia	M (limited)
Monocytosis	M
Lymphocytosis	B, T
Eosinophilia	T, M
Erythrocytosis	M (limited)
Thrombocytosis	M (limited)
Blasts in blood or marrow	B, T, M
Lymphadenopathy	B, T
Extranodal masses	B, T
Splenomegaly	B, T, M (limited)
Transformation of chronic leukemia— B cell	B
Transformation of chronic leukemia— T or NK cell	T
Staging for non-Hodgkin lymphoma— B cell	B
Staging for non-Hodgkin lymphoma— T/NK cell	T
Skin rash	B, T
Atypical cells in body fluids (CSF, serous, ocular, etc.)	B, T, M (limited)
Monoclonal gammopathy	B, P
Unexplained Plasmacytosis of bone marrow	B, P
Monitoring of Rx response (unknown diagnostic immunophenotype)	
Mature B cell neoplasm	B
Mature T or NK cell neoplasm	T
Acute lymphoid leukemia—B cell	B
Acute lymphoid leukemia—T cell	T
Acute myeloid leukemia	M
MDS/MPD/Overlap Syndrome	M
Plasma cell neoplasm	P

B, B cell; T, T cell; M, myeloid; P, plasma cell.





## EXAMPLES OF 10-COLOR FLOW CYTOMETRY PANELS<sup>a</sup> IN IMMUNOPHENOTYPING OF LEUKEMIA AND LYMPHOMA

Panel	FITC <sup>b</sup>	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC-AF700	APC-AF750	PB	KO
B-cell	kappa	lambda	CD19	CD38	CD20	CD34	CD23	CD10	CD5	CD45
T-cell	CD57	CD11c	CD8	CD3	CD2	CD56	CD7	CD4	CD5	CD45
AML-granulo	CD65	CD13	CD14	CD33	CD34	CD117	CD7	CD11b	CD16	CD45
AML-mono	CD36	CD64	CD56	CD33	CD34	CD123	CD19	CD38	HLA-DR	CD45
AML-ery-ly	CD71	CD11c	CD4	CD33	CD34	CD2	CD10	CD235a	CD15	CD45
ALL-B	CD58	CD22	CD38	CD33	CD34	CD123	CD10	CD19	CD20	CD45
ALL-T	CD7	CD1a	CD8	CD33	CD34	CD2	CD10	CD4	CD5	CD45
AL-cytoplasmic	TdT	MPO	CD14	CD33	CD34	cytCD79	cytCD22	CD19	cytCD3	CD45

<sup>a</sup>These panels are in current clinical use at the Flow Cytometry Lab., Department of Laboratory Medicine, University Health Network, Toronto General Hospital, Toronto, Ontario, Canada.

<sup>b</sup>Characteristics of fluorochromes are given in Table 2.1.