

Project gestuurd onderwijs

Hoger Laboratorium Onderwijs
2011-2012, periode 19 en 20

“Onderzoek naar mogelijkheden voor implementatie van cytochemie in het Diakonessenhuis”

Relevante kleurtechnieken ter differentiatie van acute leukemieën



**Afstudeerverslag ter verkrijging van de graad
van Bachelor of Applied Technology (BTech.) in
de studierichting Hoger Laboratorium Onderwijs (HLO)**

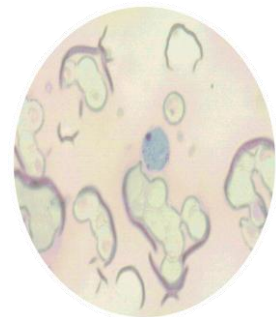
Lorensia Adipi

Paramaribo, januari 2013

“Onderzoek naar mogelijkheden voor implementatie van cytochemie in het Diaconessenhuis”

Relevante kleurtechnieken ter differentiatie van acute leukemieën

(Vakcode A991)



Naam student + registratie nr: Lorensia Adipi 10915

Bedrijf: Diaconessenhuis Paramaribo

Bedrijfsbegeleider: Uselencia Esajas-Zeegelaar Ing

Docent-begeleider: Merril Wongsokarijo MSc

Paramaribo, januari 2013

Voorwoord

Dit verslag gaat over de afstudeeropdracht uitgevoerd ter verkrijging van de bachelortitel van het Hoger Laboratorium Onderwijs (HLO) op het Polytechnic College. Er is gekozen voor het onderwerp; “Onderzoek naar mogelijkheden voor introductie van cytochemie in het Diakonessenhuis”. Dit onderzoek is gekozen in het kader van de behoefte die aanwezig is voor het *upgraden* van de afdeling Hematologie van het laboratorium. Na goedkeuring van een projectvoorstel door de directeur van de instelling en de richtingscoördinator van het Hoger Laboratorium Onderwijs (HLO) is er een start gemaakt met het project. Voorafgaand aan dit projectvoorstel is er literatuuronderzoek verricht. Voor de validatie van de methode zijn 20 monsters verzameld in voornamelijk het Diakonessenhuis, het 's Lands Hospitaal en het Streek Ziekenhuis Nickerie. Verder is informatie ingewonnen in het Pathologisch-Anatomisch Laboratorium over de verschillende vormen van leukemie die voorkomen in Suriname en het aantal beenmergpunctaten dat jaarlijks onderzocht wordt van de verschillende instellingen. In dit werkstuk heb ik mij ertoe beperkt de meest voorkomende van de, zeer heterogene, acute leukemieën aan te halen.

Een woord van dank gaat uit naar mijn begeleiders mevrouw Uselencia Esajas-Zeegelaar, Ing, Hoofd laboratorium Diakonessenhuis, de heer Merrill Wongsokarijo, MSc, mevrouw Lya Sumter, docente Nederlands, drs. Floyd Henar, patholoog en verder naar eenieder die op welke wijze dan ook meegewerkt heeft tot de voltooiing van dit werkstuk.

De samensteller,
Lorensia Adipi

Paramaribo, januari 2013

Samenvatting

Acute leukemie is een kankersoort die zich kenmerkt door accumulatie van onrijpe cellen ($\geq 20\%$) in het beenmerg en bloed en soms ook andere organen. Deze accumulatie is het resultaat van mutatie, vnl. translocatie, in de cellulaire genen, die tot gevolg heeft een overexpressie van eiwitten die betrokken zijn bij celproliferatie en apoptose (geprogrammeerde celdood). Acute leukemieën worden naar celtypen verdeeld in acute myeloïde leukemie (AML) en acute lymfoïde leukemie (ALL). In elke fase van de ontwikkeling van stamcel naar rijpe bloedcel kan er een mutatie plaatsvinden, dit resulteert in zeer heterogene subtypen van AML en ALL. Acute leukemie komt voor in alle leeftijdsgroepen, geslachten en rassen, maar bij de verschillende hoofdtypen is er een zekere predominantie waar te nemen. Zo komt AML het meest voor bij ouderen boven 60 jaar en meer bij mannen dan bij vrouwen. ALL komt meer voor bij kinderen tussen 2 en 5 jaar dan AML. 4.3% van de doden als gevolg van kanker in Suriname (2007-2009) is het gevolg van leukemie. De overlevingskans is afhankelijk van o.a de soort, het subtype en de leeftijd. Om tot de juiste diagnose te komen, moet er een diagnostisch panel gebruikt worden, bestaande uit, in eerste instantie perifere morfologie, beenmergmorfologie en cytochemie en een vervolg immunofenotypering, cytogenetica en moleculaire diagnostiek. Met de snelle trend in de ontwikkeling van de moleculaire diagnostiek, wordt de subclassificatie voornamelijk afgeleid van moleculair-diagnostische criteria. Echter, de moleculaire technieken zijn nog niet bereikbaar voor ontwikkelingslanden als Suriname. De diagnostiek in Suriname bestaat slechts uit perifere en beenmergmorfologie. Een goed morfologisch onderscheid tussen AML en ALL kan beperkt worden door de kwaliteit van beenmergaspiraten. Met enzymatische kleuringstechnieken (cytochemie) kan deze hiaat opgevangen worden. De vraag is: welke specifieke cytochemische testen kunnen geïmplementeerd worden?

Naast een voorafgaande literatuurstudie is er een marktonderzoek verricht op het Pathologisch-Anatomisch Laboratorium naar het aantal beenmergonderzoeken dat jaarlijks wordt onderzocht en bijkomende praktische problemen. Voor validatie van de testen zijn gedurende een periode van 12 maanden 20 bloedmonsters verzameld in het Diaconessenhuis,

w.o. enkele afkomstig uit het 's Lands Hospitaal en het Streekziekenhuis Nickerie. Preparaten die gemaakt zijn tot een week voor de testen, zijn na fixatie in formalinedamp en methanol, bewaard in de diepvries bij een temperatuur van -10 tot -20 °C. Preparaten die een week voor aanvang of tijdens uitvoering van de testen zijn gemaakt zijn, op kamertemperatuur bewaard. De preparaten zijn gekleurd in acht series. Elk monster is onderworpen aan vijf verschillende kleuringstechnieken; de Myeloperoxidase, de Sudan Black B, de Naphtol AS-D chloro-acetaat esterase, de Alfa naphtyl acetaat esterase en de Periodic Acid-Schiff-kleuring. Als kwaliteitscontrole zijn bij elke serie kleuringen een positieve en een negatieve controle meegenomen.

Concluderend kan gezegd worden dat de resultaten volgens verwachting zijn uitgekomen. Het is zeker mogelijk om cytochemie als diagnostische indicator te implementeren, met name de Sudan Black B en de Periodic Acid-Schiff-kleuring om cellen van de myeloïdereeks te onderscheiden van de lymfoïdereeks, de Naphtol AS-D chloro-acetaat esterasekleuring om cellen van de neutrofiele reeks aan te tonen. In twijfelgevallen kunnen ook de Myeloperoxidase en de Alfa naphtylacetaat esterasekleuring toegepast worden om cellen van de neutrofielen resp. de monocyteneeks aan te tonen. Aan de directie van het Diakonessenziekenhuis wordt aanbevolen om cytochemie in het dienstenpakket op te nemen en dit door te geven aan de andere ziekenhuizen. Verder het voortouw te nemen in een discussie met het ministerie van Volksgezondheid en mogelijkheden te bekijken voor aanschaf van een flowcytometer ter introductie van immunofenotypering in Suriname.

Summary

Acute leukemia is a type of cancer characterized by accumulation of immature cells ($\geq 20\%$) in the bone marrow and blood but sometimes in other organs as well. This accumulation is the result of mutation, mainly translocation, in the cellular genes, which results in an over expression of proteins involved in cell proliferation and apoptosis (programmed cell death). According to cell types, acute leukemias are divided into acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoid leukemia (ALL). In each phase of the development from stem cell to mature blood cell a mutation may occur, which results in very heterogeneous subtypes of AML and ALL. Acute leukemia occurs in all age groups, gender and races, but in the various main types a certain predominance is noticed. Thus AML mostly occurs in elderly people above 60 years and more in men than in women. ALL occurs more in children between 2 and 5 years than AML.

In Suriname, 4.3% of the deaths owing to cancer (2007-2009) are the result of leukemia. The survival rate depends on, among other things, the type, the subtype and the age. To come to the correct diagnosis, a diagnostic panel has to be used, consisting of, initially, periphery morphology, bone marrow morphology and cytochemistry as well as a continuing immunophenotyping, cytogenetics and Molecular Diagnostics. With the rapid trend in the development of Molecular Diagnostics, the sub-classification is mainly derived from molecular-diagnostic criteria. However, the molecular techniques are not yet accessible for developing countries like Suriname. The Diagnostics in Suriname only consists of peripheral- and bone marrow morphology. A good morphological distinction between AML and ALL can be limited by the quality of bone marrow aspirates. With enzymatic staining techniques (Cytochemistry), this gap can be corrected. The question is, which specific cytochemical tests can be implemented?

In addition to a prior literary study, a market research survey has been conducted at the Pathological-Anatomical laboratory to the number of bone marrow research that is examined annually as well as additional practical problems. For the validation of the tests, 20 blood samples have been collected during a period of 12 months in the Diakonessenhuis, among which a small amount came from 's Lands Hospitaal' and 'Streekziekenhuis Nickerie'.

Preparations made up to a week before the tests, were, after fixation in formalin vapor and methanol, kept in the freezer at a temperature of -10 to -20 °C. Preparations made a week before or during execution of the tests were kept at room temperature. The preparations have been stained in 8 series. Each sample is subjected to 5 different staining techniques; the Myeloperoxidase, the Sudan Black B, the Naphtol AS-D chloro-acetate esterase, the Alpha Naphtyl Acetate Esterase and the Periodic Acid-Schiff staining. As quality control, a positive and a negative control have been included in each stains series.

In conclusion it can be said that the results turned out as expected. It is certainly possible to implement Cytochemistry as diagnostic indicator, namely the Sudan Black B and the Periodic Acid-Schiff staining to distinguish cells from the myeloid lineage from the lymphoid lineage, the Naphtol AS-D chloro-acetate esterase staining in order to identify cells from the neutrophil series. In cases of doubt, the Myeloperoxidase and the Alfa naphtylacetate esterase staining can also be applied to indicate cells of respectively the neutrophils and the monocytes series. The management of the Diakonessenziekenhuis is recommended to include Cytochemistry in the packageservices, and to inform the other hospitals about this. Furthermore, they should also take the lead in a discussion with the Ministry of Public Health to look for opportunities to purchase a flowcytometer to introduce immunophenotyping in Suriname.

INHOUDSOPGAVE

VOORWOORD

SAMENVATTING

SUMMARY

LIJST VAN AFKORTINGEN

LIJST VAN FIGUREN EN TABELLEN

1 INLEIDING	11
1.1 Doelstelling.....	12
1.2 Probleemstelling	12
1.3 Onderzoeksmethoden	12
2 LEUKEMIE	14
2.1 De hematopoëse.....	15
2.2 Acute leukemie	17
2.3 Classificatie van acute leukemie.....	23
3 DIAGNOSTIEK VAN ACUTE LEUKEMIE	26
3.1 Markers voor de diagnostiek	26
3.2 Relevante testmethodes	28
3.3 Cytochemie	29
3.4 Analyse en validatie.....	30
3.5 Resultaten	35
3.6 Kostencalculatie.....	41
4 DISCUSSIE, CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN	42
LITERATUURLIJST.....	44
BIJLAGENLIJST.....	47

Lijst van afkortingen

Afkortingen

ABL:	Abelson (v-abl Abelson <i>murine leukemia viral oncogene homolog 2</i>)
ALL:	acute lymfoblasten leukemie
AML:	acute myeloïde leukemie
ANAE:	alfa naphthylacetaat esterase
APL:	acute promyelocyten leukemie
AUL:	acute <i>undifferentiated</i> leukemie
BCR:	<i>breakpoint cluster region</i>
CD:	<i>cluster of differentiation</i>
ChlorE:	naphtol AS-D chloro-acetaat esterase
DIS:	diffuus intravasale stolling
MDS:	myelodysplastisch syndroom
MLL:	<i>myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia</i>
MPO:	myeloperoxidase
PA-lab:	Pathologisch-Anatomisch Laboratorium
PAS:	<i>periodic acid-Schiff</i>
PML:	<i>promyelocytic leukemia protein</i>
pre-B ALL:	precursor B Acute lymfoblastisch leukemie
pre-T ALL:	precursor T Acute lymfoblastische leukemie
RAEB-t:	<i>Refractory anaemia with excess blasts in transformation</i>
SBB:	<i>Sudan Black Blue</i>
TEL:	<i>translocation ets leukemia</i>

Lijst van figuren en tabellen

Figuren

Figuur 1 Schema van celdeling en differentiatie.....	16
Figuur 2 Leukemiecellen (blasten) hebben de normale beenmergcellen verdrongen.....	18
Figuur 3 Voorbeeld van een chromosoomtranslocatie.....	20
Figuur 4 Morfologische kenmerken van (rijpe) bloedcellen.....	27
Figuur 5 Enkele voorbeelden van cytochemische reacties van de uitgevoerde kleuringen	35
Figuur 6 Schema van de hematopoëse	49
Figuur 7 B- en T-cel differentiatieschema	50

Tabellen

Tabel 1 De meest voorkomende cytogenetische translocaties en hun prognose.....	22
Tabel 2 A en B WHO-classificatie van acute leukemie.....	24
Tabel 3 Referentiewaarden bij een perifeer differentiële telling.....	31
Tabel 4 Referentiewaarden beenmergdifferentiatie	32
Tabel 5 Cytochemische scoring van de cellen en interpretatie	33
Tabel 6 Verwachte cytochemische reacties in normale bloedcellen en blasten van acute leukemieën	33
Tabel 7 Cytochemische beoordeling van de geïdentificeerde casussen acute leukemieën.....	36
Tabel 8 Kostencalculatie en kostprijsberekening cytochemische testen.....	41
Tabel 9 Aantal beenmergonderzoekaanvragen en uitslagen PA-lab tussen 2008-2011	48
Tabel 10 A en B Reproduceerbaarheid van de kwaliteitscontrole	52
Tabel 11 Percentages cytochemische scores.....	54
Tabel 12 Kostencalculatie uitgevoerde cytochemische testen en kostprijsberekening.....	55

1 Inleiding

In het kader van de behoefte aan meer kleurtechnieken ter onderscheiding van de diverse soorten leukemieën binnen de afdeling Hematologie is er een onderzoek gepleegd naar mogelijkheden voor de implementatie van cytochemie in het Diaconessenhuis. Volgens data van de afdeling Epidemiologie van het Bureau voor Openbare Gezondheidszorg (B.O.G) in Suriname (2007-2009) zijn maligne aandoeningen op de derde plaats van doodsoorzaken in Suriname; circa 350 doden per jaar. Een belangrijk deel (4.3%) hiervan wordt veroorzaakt door leukemie. Naar het celtype wordt leukemie verdeeld in myeloïd en lymfoïd en naar rijpingsdissociatie in acuut en chronisch. Zo komt men tot een onderverdeling van onder andere: acute myeloïde leukemie (AML) en acute lymfoïde leukemie ALL (waar dit verslag over gaat), CLL en CML (niet van belang voor dit verslag) (zie par.2.1, blz. 15 voor gedetailleerde onderverdeling). Om te komen tot de juiste diagnose, moet er een uniforme en systematische benadering toegepast worden op elke casus. De *hallmark* voor de diagnostiek van acute leukemie is **morfologie** en **cytochemie** (Hoffbrand, Pettit & Moss, 2001; Hoffmann, Akkerman, Nieuwenhuis & Overbeeke, 2007; Schumacher, 1990). In Suriname bestaat de diagnostiek slechts uit morfologische beoordeling.

De kwaliteit van beenmergaspiraats is niet altijd goed te noemen (zie tabel 9, bijlage I). Dit kan leiden tot discrepantie tussen de perifere morfologie en de beenmergmorfologie. Deze hiaat in het diagnostische proces kan tevens leiden tot het terecht/onterecht sturen van patiënten naar het buitenland of terecht/onterecht niet sturen van de patiënt voor de juiste behandeling. AML vereist een heel andere therapie dan ALL. Door differentiatie van de verschillende vormen van leukemie, kan eerder een gerichte therapie aan de patiënt geboden worden. Deze differentiatie kan gemaakt worden op basis van enzymatische kleurtechnieken.

1.1 Doelstelling

Het doel van dit project is het implementeren van cytochemische kleurtechnieken ter differentiatie van acute leukemieën.

1.2 Probleemstelling

De probleemstelling is als volgt geformuleerd:

“Welke specifieke cytochemische testen kunnen geïmplementeerd worden voor de differentiatie van acute leukemieën?”

Voor een goed onderbouwde beantwoording van deze kernvraag, dient eerst antwoord gegeven te worden op de volgende deelvragen:

- Wat is leukemie?
- Hoe worden de verschillende leukemieën geclassificeerd anno 2012?
- Welke criteria worden er gehanteerd?
- Welke relevante testmethodes zijn beschikbaar?
- Is er nog plaats voor cytochemie in de diagnostiek van acute leukemieën?
- Hoe worden deze methodes gevalideerd?

1.3 Onderzoeksmethoden

- Er is literatuurstudie verricht.
- Er is een marktonderzoek gedaan naar het voorkomen van de verschillende soorten leukemieën in Suriname.
- Er zijn bloedmonsters verzameld van 20 patiënten in de ziekeninstellingen Diakonessenhuis, 's Lands Hospitaal en Streekziekenhuis Nickerie.

Er komen diverse soorten leukemieën voor die een uiteenlopende oorsprong hebben. Om te komen tot diagnose van leukemieën is het noodzakelijk om het proces van de bloedvorming (hematopoëse) en de historie van leukemie te begrijpen. Voor het stellen van de juiste diagnose die kan leiden tot een gerichte therapie, worden leukemieën in verschillende

categorieën gegroepeerd. Echter, met de snelle trend in de ontwikkeling van moleculaire technieken, vindt er voortdurend aanpassing plaats van bestaande classificatie, die leidt tot veranderende *approach* in het diagnostische proces. In hoofdstuk 2 wordt een overzicht gegeven van de verschillende criteria en classificaties die gebruikt worden voor de verschillende leukemieën. Voorts wordt in hoofdstuk 3 de laboratoriumdiagnostiek, waaronder de aanbevolen diagnostische markers en relevante testmethodes, beschreven. Ten slotte worden in hoofdstuk 4 een conclusie en aanbeveling gegeven voor de te implementeren testmethodes of technieken.

2 Leukemie

Inleiding

De eerste heldere vermelding van leukemie werd omschreven door Velpeau in 1827 (Schumacher, 1990). Greaves (in McGlaulin, Munger, & Nelson, 2005) stelde dat leukemie niet eerder officieel gediagnosticeerd werd tot 1845, toen John Hughes Benett in Edinburgh de diagnose stelde. In Europa observeerden doktoren in de 19^{de} eeuw dat hun patiënten extreem hoge aantallen leukocyten hadden en noemden de ziekte “weisses blut,” wat betekent “wit bloed.” De term “leukemia” die nu gebruikt wordt, komt van de Griekse woorden “leukos” en “heima,” en betekenen ook “wit bloed” (*Leukemia and Lymphoma Society, 2005*). In 1913, werden 4 typen leukemie geclassificeerd: chronische lymphocyten leukemie, chronische myelogenous leukemie, acute lymphocyten leukemie en erythroleukemie. In 1970 werd bevestigd dat sommige patiënten konden genezen van leukemie, en tegen de jaren 80 en 90 waren de *cure rates* van leukemie rond 70% (Pui in McGlaulin, Munger & Nelson, 2005). Anno 2012 wordt er een *cure rate* van tegen de 90% gehaald (art.: “*Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia*”, Updated: Mar 14, 2012; Mittal & Meehan, 2001. p42).

De meest simpele bewoording van de definitie van leukemie is weergegeven door Hoffbrand et al. (2001): “Leukemie is een kankersoort die gekarakteriseerd wordt door accumulatie van maligne (witte) bloedcellen in het beenmerg en het bloed”. Deze abnormale cellen veroorzaken symptomen door:

- a. verminderde aanmaak van de andere bloedcellen met als gevolg anemie, neutropenie en trombopenie;
- b. infiltratie van organen, zoals de lever, de milt, lymfeklieren, hersenen, meninges en testes.

Leukemie ontstaat door veranderingen die plaatsvinden in de cellulaire genen. Deze veranderingen kunnen zijn translocaties, duplicaties of deleties. De meest voorkomende verandering bij hematologische maligniteiten is het gevolg van chromosoomtranslocatie (zie fig.3, blz. 20). Het gevolg van deze translocatie is dat er een fusie-gen ontstaat dat een

overexpressie teweegbrengt van eiwitten, die betrokken zijn bij celgroei, celproliferatie en apoptose. Voor een goed begrip van de veranderingen die optreden in de normale cellen die leukemie als gevolg hebben, wordt in subhoofdstuk 2.1 de hematopoëse (vorming van bloedcellen) en de verschillende leukemieën die kunnen ontstaan, beschreven. Voorts worden de kenmerken van acute leukemie uit de diverse cellijnen van de hematopoëse en de classificatie van deze leukemieën beschreven in respectievelijk subhoofdstuk 2.2 en 2.3. De belangrijkste bronnen die geraadpleegd zijn voor dit hoofdstuk zijn:

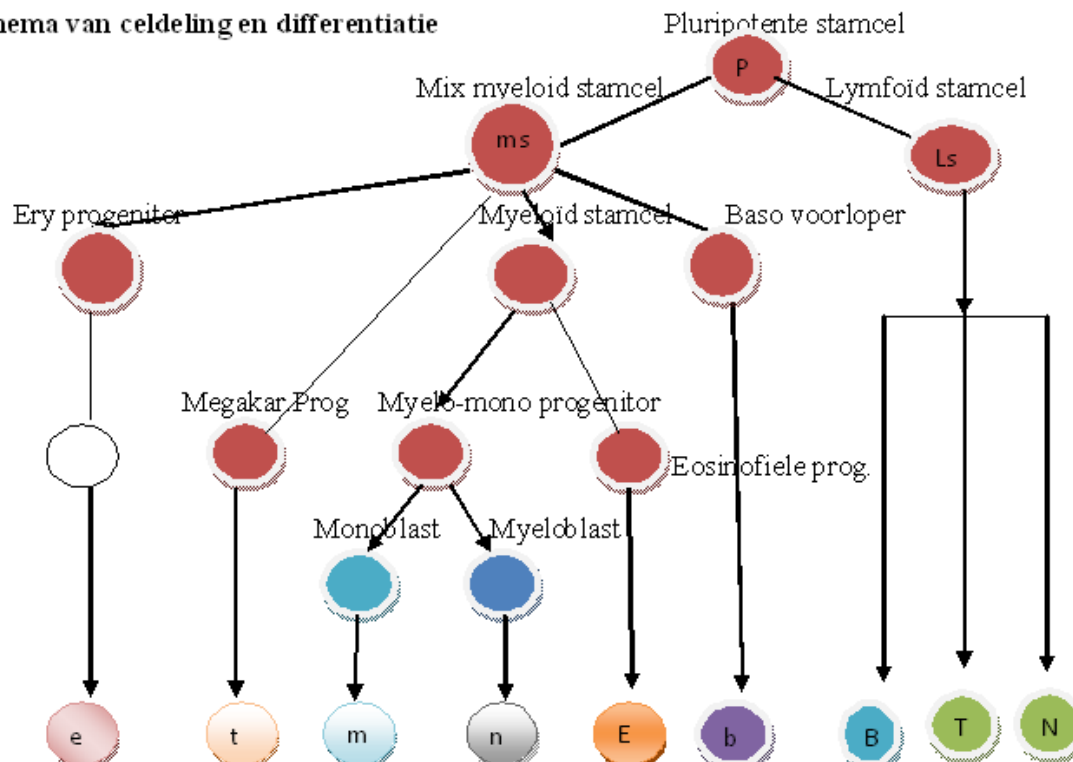
A.D.A.M. Medical Encyclopedia, laatste update 2011; Hoffmann et al., 2007; Hoffbrand et al., 2001; Schumacher, 1990; *American Cancer Society*, 2010; *Universitair Medisch Centrum Groningen* [UMCG], 2011.

2.1 De hematopoëse

De vorming van bloedcellen vindt voornamelijk plaats in het beenmerg, maar ook in de milt, lever en de lymfklieren. De aanmaak van bloedcellen betreft twee processen; proliferatie (celdeling) en differentiatie (uitrijping).

Hematopoëse is het proces waarbij uit één stamcel (pluripotent) door deling en rijping meerdere functionele bloedcellen ontstaan (zie fig.1, blz. 16). De pluripotente stamcel heeft het vermogen om zich door proliferatie (celdeling) te vermenigvuldigen. Daarnaast kan hij differentiëren tot de specifieke voorlopercel van elke soort. Uit de pluripotente stamcel wordt in eerste instantie een multipotente stamcel gevormd. Uit deze stamcel kunnen twee typen stamcellen (*progenitor cells*) ontstaan: de multipotente myeloïde stamcel en de lymfoïdestamcel. Uit de myeloïde stamcel ontstaan er verschillende voorlopercellen; w.o. voorlopercel van de megakaryocyten cellijn, die uitrijpt tot trombocyten, de voorlopercel van de erythrocytencellijn, die uitrijpt tot erythrocyten en de myelomonocytoïde voorlopercel, die uitrijpt tot neutrofielen en monocyt. De lymfoïde stamcel differentieert zich in o.a. de lymfocyten voorlopercel die verder differentieert in NK-cel, B- of T-celijn, die uiteindelijk uitrijpt tot resp. B-lymfocyten en T-lymfocyten. In figuur 1 is een overzicht van de hematopoëse weergegeven (zie gedetailleerd overzicht van de hematopoëse en een B- en T cel differentiatieschema in bijlage II en III).

Schema van celdeling en differentiatie



Figuur 1. Schema van celdeling en differentiatie

Bron: gemodificeerd uit Hoffbrand et al.

Er zijn verschillende hematologische maligniteiten bekend, zoals myelodysplastisch syndroom, myelo- en lymfoproliferatieve aandoeningen en acute leukemieën. Deze aandoeningen ontstaan alle uit de verschillende stadia van de normale hematopoëse.

Leukemieën worden naar rijpingsdissociatie verdeeld in:

1.Acute leukemie; In acute leukemie, zijn de abnormale bloedcellen onrijpe cellen (blasten). Ze kunnen hun normale functie niet vervullen en delen ongelimiteerd, waardoor de ziekte snel verergert.

2.Chronische leukemie. Deze vorm van leukemie betreft de meer rijpe bloedcellen. De deling of accumulatie van cellen gaat iets langzamer en de cellen kunnen voor een langere periode functioneren.

Elk type leukemie is genoemd naar het celtype en de rijpingsdissociatie; een myeloïde of een lymfoïde cel en het al dan niet beginnen in een rijpe of onrijpe cel. De volgende classificatie wordt gehanteerd:

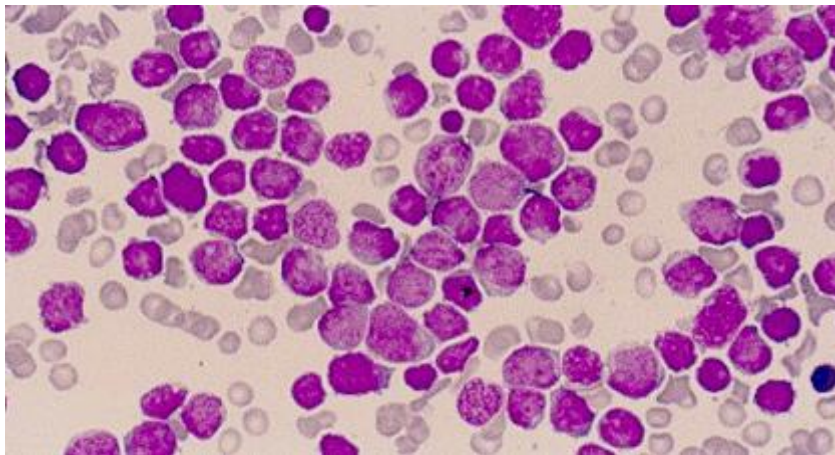
- acute myeloïde leukemie (AML)
- acute lymfoblastische leukemie (ALL)
- chronische myeloïde leukemie (CML)
- chronische lymfocyten leukemie (CLL)

(Hoffbrand et al., 2001; *A.D.A.M. Medical Encyclopedia*, laatste update 2011).

Naast de bovengenoemde leukemieën, zijn er andere myelo- en lymfoproliferatieve aandoeningen bekend. Vanwege de relatie tot AML, kan genoemd worden het myelodysplastisch syndroom (MDS) dat vroeger werd gerekend tot een chronische aandoening. MDS heeft een tendens om over te gaan in een blastencrisis. In de recentste classificatie volgens de *World Health Organization* (WHO), wordt MDS nu gerekend tot AML (zie subhoofdstuk 2.3; “Classificatie van acute leukemie”).

2.2 Acute leukemie

Acute leukemie wordt gedefinieerd als een groep van aandoeningen die gekenmerkt worden door accumulatie van maligne witte cellen in het beenmerg en het bloed. Het aantal blasten in het beenmerg is hierbij groter dan of gelijk aan 20% (WHO-classificatie) van de kernhoudende beenmergcellen (Hoffbrand et al., 2001; Hoffmann et al., 2007; Schumacher, 1990), zie fig.2, blz. 18. Indien moleculair-genetische abnormaliteit vaststaat, wordt al bij een blastenaantal van 1% de diagnose “acute leukemie” gesteld (UMCG, 2011). Acuut geeft aan dat de leukemie snel groeit. Indien onbehandeld, is zij dodelijk binnen enkele weken/maanden.



Figuur 2. Leukemiecellen (blasten) hebben de normale beenmergcellen verdrongen

Bron : <http://www.hematologiegroningen.nl/patienten/content/3AML.htm>

Epidemiologie

Acute leukemie komt bij elke leeftijd voor. De subklasse AML komt meer (80% van alle gevallen) voor bij ouderen boven 60 jaar dan bij kinderen en meer bij mannen dan bij vrouwen voor. Bij kinderen beneden 15 jaar komt ALL het meest voor (ca. 30% van kanker bij kinderen) (Mittal & Meehan, 2001). De incidentie is het hoogst tussen 2 en 5 jaar en neemt met de leeftijd af om weer een piek te bereiken bij ouderen voornamelijk bij 65 jaar en ouder (Addison et al., 1999; Carrol & Finlay, 2010). De prevalentie van doden als gevolg van kanker in Suriname is in 2008 bij mannen 107,1 en bij vrouwen 87,8 per 100.000 inwoners (WHO, 2011). Het aantal doden als gevolg van kanker bedroeg 376 in 2008 en 350 in 2009 w.o. respectievelijk 14 en 15 als gevolg van leukemie (B.O.G, 2011).

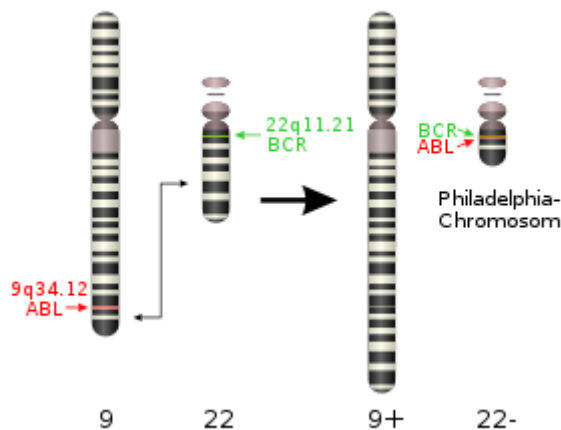
Etologie

De exacte oorzaak van leukemie is niet bekend. Er zijn wel verschillende factoren die het risico op het krijgen van acute leukemie vergroten zoals: blootstelling aan een hoge dosis straling zoals chemotherapie en langdurige blootstelling aan bepaalde industriële chemicaliën zoals benzeen. Andere risicofactoren kunnen zijn langdurig alcoholgebruik, sigarettenroken en drugsgebruik. Sommige leukemieën worden geassocieerd met virusinfecties zoals het Epstein Barr Virus bij de Burkitt's Lymphoma (Addison et al., 1999; Mazouni et al., 2010; Tarrand et al., 2010) en HTLV-I bij *adult* T-lymfocyt leukemie (ATLL). Ook genetische

factoren vormen grotere risico voor het ontwikkelen van leukemie, zoals monozygote tweelingen, dizygote tweelingen, trisomie-21 en andere ziektes met chromosomale fragiliteit. ALL bij kinderen beneden 15 jaar ontstaat al in prenatale fase. Tevens is bekend dat chromosomale translocaties bij 60-70% van de volwassenen en ongeveer 80% van de kinderen met leukemie voorkomen (Addison et al., 1999; Carroll & Finlay, 2010.).

Pathofysiologie

Bij een normale hematopoëse vindt de celdifferentiatie van stamcel tot functionele cellen naar behoefte plaats. In acute leukemie, is het proces van celdifferentiatie onderbroken (gestoord) in de cellen die gecommitteerd zijn in de myeloïde of lymfoïde cellijn. Deze storing kan ontstaan door transformatie (mutatie) in een stamcel. De transformatie kan optreden op elk punt vanaf de ontwikkeling van stamcel tot de voorloper van een bepaalde cellijn. De transformatie kan *de novo* zijn of door eerder doorgemaakte therapie. Er zijn verschillende vormen van transformatie beschreven door cytogenetische studies zoals, translocatie, inversie, deletie, duplicatie. Zoals eerder bij de inleiding in hoofdstuk 2 aangehaald, zijn de meeste hematologische transformaties het gevolg van chromosomale translocaties (zie fig. 3, blz. 20).



Figuur 3. Voorbeeld van een chromosoomtranslocatie

Bron: http://en.wikipedia.org/wiki/Philadelphia_chromosome

De meest bekende translocatie is de t(15;17) (lees: translocatie tussen chromosoom 15 en chromosoom 17); deze resulteert in een AML met abnormale promyelocyten, APL (Akagi et al., 2009). Bij deze translocatie vindt er een fusie plaats tussen de *retinoic acid receptor alpha* van chromosoom 15 en de PML gen op chromosoom 17. Het ontstane fusie-gen leidt tot inhibitie van differentiatie tot granulocyten. Andere transformaties zijn: t(8;21), inv(16) en t(16;16).

De ontwikkeling van ALL heeft evenals AML ook als basis transformatie van een stamcel of de *progenitor* van de lymfoïde cellen van B- of T-celijn of in eerdere voorlopers. De meest bekende chromosomale translocatie bij ALL is de t(12;21)(p12-13;q22). De translocatie genereert een fusie-gen (TEL-AML1) dat de oorzaak is van pre-B ALL (zie bijlage III differentiatie schema B-en T-cel). Andere transformaties zijn t(9;22)(q34;q11), die de BCR-ABL fusie-gen (p185) genereert en *rearrangements* van het MLL-gen op chromosoom 11q23 (Esparza & Sakamoto, 2005) en is de oorzaak van Pro-B ALL. Deze laatste heeft als gevolg een hoog aantal leucocyten.

MDS is een groep van neoplasmas van multipotente hematopoëtische stamcellen en betreft alle myeloïde cellijnen (fig.1, blz.16).

Klinische manifestatie van acute leukemie

Patiënten presenteren zich in het algemeen met non-specifieke klachten w.o zwakte, slaperigheid, vermoeidheid, benauwdheid, koorts, pijn in beenderen, gewichtsverlies of bloeding. Hepatosplenomegalie en adenopathie wordt bij fysieke controle waargenomen. De symptomen zijn het gevolg van directe infiltratie van organen, door verminderde aanmaak van de normale bloedcellen (Addison et al., 1999; Mittal & Meehan, 2001).

De klinische symptomen van ALL presenteren zich slechts enkele weken voor de diagnose en zelden duurt het maanden voor het stellen van een diagnose (Addison et al., 1999).

AML manifesteert zich heel vaak met de klinische bijverschijnselen afkomstig van pancytopenie; zwakte als gevolg van de verminderde aanmaak van rode bloedcellen, malaise of dyspnoea. Infectie kan optreden door zeer verlaagd aantal witte bloedcellen. In sommige gevallen kan hyperleukocytosis leiden tot oculaire of cerebrale dysfunctie. Een laag aantal trombocyten leidt tot petechiae, tandvlees- en neusbloedingen of menorrhagia (Hoffbrand et al., 2001; Estey, 2012).

APL is een apart type van AML dat zich manifesteert door hemorragische complicaties waaronder diffuus intravasale stolling (DIS). 4 tot 6 weken voor de diagnose kan de patiënt klagen over een griepachtige gevoel. Sommige patiënten kunnen zich presenteren met hyperleukocytosis en of leukostasis. Deze veroorzaken verslechtering van de bloedstroom, leidend tot neurologische verschijnselen met hoofdpijn, lethargy en pulmonary symptomen.

Prognose

De prognose (zie ook tabel 1, blz. 22) bij acute leukemie is verschillend tussen verschillende individuen en is afhankelijk van diverse factoren. De factoren worden afgeleid van;

- 1. kenmerken die blasten hebben** (morfologie, immunofenotype en cytogenetica). Op basis van morfologie blijkt ALL-L2 en L3 (Burkitt's type) een slechte prognose te hebben. Cytogenetisch blijkt de t(12;21)(p12-13, q22)-TEL/AML1- translocatie, die het meest voorkomt bij kinderen, de beste prognose met een *cure rate* van ca. 90% te hebben. De t(9;22), bekend als het Philadelphia chromosoom (BCR/ABL) bij pediatrie ALL heeft daarentegen een slechte prognose (slechts 15% 5-jarige *event-free*). Ook de

MLL *rearrangement* bij Pro-B ALL bij zuigelingen wordt geassocieerd met een slechte prognose (Hee Young Chung et al., 2010; Wynendaele, 2009), tabel 1.

2. **de leeftijd waarop de ziekte zich manifesteert.** ALL, die bij kinderen tussen 1-10 jaar het meest voorkomt, heeft een betere prognose, dan bij volwassenen; een *cure rate* van 90 % bij kinderen (art.: “*Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia*”, Updated: Mar 14, 2012) en bij volwassenen een *cure rate* van ca. 50% wordt gehaald. AML die bij volwassenen het meest voorkomt, wordt er een 5-year-survival bereikt dat oploopt tot ca. 70% voor hen die jonger zijn dan 60 jaar.
3. **etniciteit en geslacht.** Leukemie komt meer voor bij blanken dan zwarten en iets meer bij mannen dan vrouwen.
4. **het aantal leucocyten bij de diagnose.** Een leukocytenaantal van $< 50 \times 10^9/L$ bij de diagnose heeft invloed op overlevingskansen.

Tabel 1 De meest voorkomende cytogenetische translocaties en hun prognose

Cytogenetische translocatie	Moleculaire abnormaliteit (fusie-gen)	Soort acute leukemie	Prognose (<i>cure rate</i>)
t(12;21)(p12-13;q22)	<u>TEL-AML1</u>	pre-B ALL	Goed (90%)
t(1;19)(q23;p13)	<u>E2A-PBX (PBX1)</u>	pre-B ALL	*
t(9;22)(q34;q11)	<u>BCR-ABL</u> (p190)	pre-B ALL	Slecht (15%)
t(4;11)(q21;q23)	<u>MLL-AF4</u>	pro-B ALL	Slecht
t(8;14)(q24;q32)	<u>IGH-MYC</u>	Burkitt's type	Slecht
t(8;21)(q22;q22)	ETO en CBF α ,	AML (M2)	Gunstig
t(15;17)	RAR α , PML	APL	Goed

Bron: Bennett et al; Berends, 1997*; Pakakasama et al;

- T(1;19)E2A-PBX neg heeft betere prognose dan E2A-PBX pos translocatie

2.3 Classificatie van acute leukemie

Voor de diagnostiek en de behandeling van acute leukemie heeft een groep van Franse, Amerikaanse en Britse hematologen in 1976 de zogenaamde FAB-classificatie opgesteld. Hierin worden acht subtypen AML, drie subtypen ALL en vijf subtypen MDS (eerder gerekend tot chronische aandoening) onderscheiden op grond van morfologische en cytochemische eigenschappen. In 1985 werden de criteria herzien, resulterend in negen subtypen AML en de drie eerder bekende subtypen ALL (Schumacher, 1990). De voortschrijdende ontwikkeling in de moleculaire diagnostiek heeft geleid tot herziening van de oorspronkelijke FAB-classificatie (zie bijlage IV) in 1997, 2001 en vervolgens in 2008 door de WHO op basis van immunofenotypering, genetische criteria (Vardiman et al., 2009) en prognostische factoren (*American Cancer Society*, 2010).

De diagnose “acute leukemie” wordt gesteld wanneer er 20% of meer blasten in bloed of beenmerg voorkomen. Voor subtypering wordt rekening gehouden met de bekende prognostische parameters, in de eerste plaats chromosoomafwijkingen. Bij AML wordt er vervolgens gelet op tekenen van dysplasie en eerder cytostaticagebruik, voor de resterende AML's blijft een soort FAB-classificatie over. De classificatie van ALL wordt gemaakt op basis van immunofenotypering. Tabel 2, blz. 24 geeft een overzicht van de 2008 WHO-classificatie van acute leukemie.

Tabel 2 A en B WHO-classificatie van acute leukemie

A. WHO-classificatie van AML (<i>American Cancer Society</i> , 2010; UMCG, 2011)	
Categorie	Subtype
1. AML met bepaalde <i>recurrent</i> cytogenetic afwijkingen	AML met een translocatie tussen chromosoom 8 en 21 (FAB- M2)
	AML met een translocatie of inversie in chromosoom 16
	AML met deletie in chromosome 11
	APL, met een translocatie tussen chromosoom 15 en 17 (FAB-M3)
2. AML met dysplasie in minimaal 2 cellijnen (MDS-AML)	
3. AML ten gevolge van eerdere chemotherapie	
4. AML niet nader gespecificeerd (overige)	○ M0 of AML zonder uitrijping ○ M1 of AML met minimale differentiatie ○ M4 of acute myelomonocytenleukemie; ○ M5 of acute monocytenleukemie; ○ M6 of acute erytroïde leukemie; ○ M7 of acute megakaryocytenleukemie; ○ Acute basofiele leukemie; ○ Acute panmyelose met myelofibrose; ○ Acute bifenotypische leukemie: blasten met co-expressie van zowel myeloïde als lymfatische markers.

Bij de eerste categorie van AML wordt er al bij 1% blast de diagnose van AML gesteld. (*American Cancer Society*, 2010; UMCG, 2011).

B. WHO-classificatie van ALL (<i>Wiki flow</i>, 2009)	
Categorie	subtype
1-Acute lymfoblasten leukemie (FAB L1, L2)	Precursor B acute lymfoblasten leukemie ○ t(12;21)(p12, q22) TEL/AML-1 ○ t(1;19)(q23; p13) PBX/E2A ○ t(9;22)(q34; q11) ABL/BCR ○ t(V,11)(V; q23) V/MLL Precursor T acute lymfoblastenleukemie
2- Burkitt's leukemie/lymfoom (FAB L3)	
3- Biphentypisch acute leukemie	

3 Diagnostiek van acute leukemie

Inleiding

In de revisie van de WHO-classificatie van acute leukemie in 2008 is aanbevolen om een multifacette aanpak voor de diagnostiek toe te passen. Om te komen tot de juiste diagnose, moet er een systematische *approach* toegepast worden op elke casus. Een initieel diagnostisch proces bestaande uit morfologie (perifeer bloed en beenmergaspiraat) en cytochemie en een *follow-up* bestaande uit immunofenotypering, cytogenetica en moleculaire analyses. De initiële diagnostiek dient om AML te onderscheiden van ALL. De follow-up is nodig voor de subtypering teneinde een gespecialiseerde therapie toe te passen. In de subparagrafen 3.1 en 3.2 worden respectievelijk de verschillende markers die van belang zijn voor de diagnostiek en de relevante testmethodes besproken. In subhoofdstuk 3.3 worden de cytochemische aspecten van de verschillende methodes belicht. In subhoofdstuk 3.4 wordt een analyse gegeven van de uitgevoerde kleuringen en kwaliteitscontrole voor de validatie van de methode. In subhoofdstuk 3.5 wordt uitleg gegeven over de beoordeling van de cytochemische reactie van vier specifieke casussen. Ten slotte wordt in subhoofdstuk 3.6 een kostencalculatie gemaakt van de te implementeren testen. De belangrijkste bronnen die geraadpleegd zijn voor dit hoofdstuk zijn: Abdulsalam (2010), Bennett et al. (1995), Sigma-Aldrich (2003).

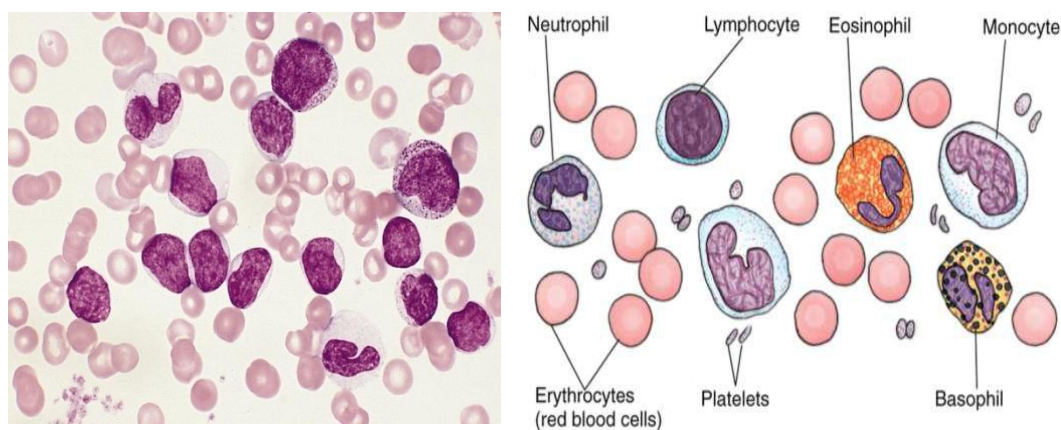
3.1 Markers voor de diagnostiek

Er zijn verscheidene markers die gebruikt worden in de diagnostiek van acute leukemie. Deze zijn o.a.:

1. morfologische eigenschappen van de cellen;
2. glycoproteïnen, mucopolysacchariden en lipiden op het celmembraan en in het celcytoplasma;
3. mutaties in de celgenen en
4. moleculaire abnormaliteit

Ad 1 Morfologische eigenschappen van de cellen

De differentiatie van stamcellen naar functionele cellen gaat gepaard met structuur- en vormverandering alsook het vormen van o.verschillende granula en enzymen in het celcytoplasma en lipiden op de celmembraan en in het cytoplasma, die typerend zijn voor de verschillende cellen en rijpingsstadia. Door middel van kleuring-technieken worden deze structuren, vormen, granula (o.a. azurofiele, lysosomale, histamine, heparine) en enzymen (o.a. peroxidase, fosfatase, esterase, terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) zichtbaar gemaakt (fig.4). Deze aspecten vormen de basis van de bloedcellenmorfologie (perifere morfologie, beenmergmorfologie en cytochemie).



Figuur 4. Morfologische kenmerken van (rijpe) bloedcellen

Bron: Polytechnic College Hematologie, oktober 2011

Ad 2 Glycoproteïnen op de celmembraan en in het cytoplasma

Hematopoëtische cellen beschikken over verscheidene antigenen zowel op het celmembraan als in het cytoplasma die kenmerkend zijn voor de verschillende cellijnen en celsoorten. Voor het herkennen van bloedcellen wordt er gebruikgemaakt van monoklonale antistoffen die reageren met de antigenen op het celmembraan. Er zijn duizenden bekende antistoffen die worden verdeeld in groepen die aan elkaar verwant zijn, de zogenaamde *cluster of differentiation* (CD). De verschillende clusters hebben een nummervolgorde. Op basis van deze clusters wordt er onderscheid gemaakt tussen de verschillende leukocyten (immuno-

fenotypering). In bijlage III is een overzicht van de CD-markers van de verschillende soorten cellen (lymfoïdereeks) weergegeven.

Ad 3 Mutaties in de celgenen

Andere diagnostische markers vormen de mutaties in het genetisch materiaal zoals eerdergenoemde translocatie. Sommige mutaties hebben een breekpunt (deletie) of een duplicatie in een deel van de bouwstenen van het DNA (de-oxiribonucleair acid). Andere vormen een inversie (omgekeerde volgorde). De genoemde aspecten vormen de basis voor cytogenetica bij acute leukemie. Hierbij wordt het chromosoom in zijn geheel bestudeerd.

Ad 4 Moleculaire abnormaliteit

Het gevolg van mutaties in de celgenen is het ontstaan van fusie-genen (abnormale genen). Deze genen kunnen met de hedendaagse moleculair-diagnostische technieken worden aangetoond.

3.2 Relevante testmethodes

De *International Council for Standardization in Hematology* (ICSH) heeft aanbevolen om een minimum cytochemisch en immunologisch diagnostisch panel te definiëren zodat laboratoria die niet over geavanceerde technieken beschikken toch tot een precieze en informatieve diagnose kunnen komen. Bennett et al. (1995) pleit daarom voor 3 opeenvolgende onderzoeksfasen en wel; cytochemie en intracellulaire fenotypering voor de initiatie en membraanfenotypering voor confirmatie, diagnostische duidelijkheid van atypische leukemie en het subtyperen van ALL. De minimale cytochemie betreft: Myeloperoxidase (MPO), Chloroacetate esterase (ChlorE) en alpha-naphtyl acetate esterase (ANAE). Abdulsalam (2010) heeft voorgesteld om Sudan Black B (SBB) in plaats van MPO en Periodic Acid Schiff (PAS) te gebruiken om de kans op een correcte diagnose voor ALL te stellen.

3.3 Cytochemie

Cytochemie is de studie van de chemische bestanddelen die geassocieerd zijn met cellen. Deze bestanddelen zijn specifiek voor bepaalde celtypen. In de hematologie wordt cytochemie gebruikt om leukemische cellen te differentiëren. Cytochemische kleuringen reageren met de chemische bestanddelen van witte bloedcellen zoals neutrofielen, monocyt en lymfocyten. In de abnormale leukemische cellen worden deze bestanddelen geassocieerd met een bepaalde stamcel, lymfoïde of niet-lymfoïde stamcel (Sigma-Aldrich, 2003). De volgende kleurtechnieken worden gebruikt;

1. Voor differentiatie tussen cellen van de myeloïde en lymfoïde reeks

A. De myeloperoxidase (MPO) kleuring; wordt gebruikt voor differentiatie tussen cellen van de myeloïde en lymfoïdereeks. Het enzym, peroxidase, komt voor in de granula van myeloïde cellen bestaande uit de granulocyten- en monocyt reeks. Naarmate de cel uitrijpt neemt de peroxidase activiteit in de granulocytenreeks toe. In het algemeen vertoont de lymfoïdereeks geen myeloperoxidase activiteit.

B. De Sudan Black B (SBB); kleurt verschillende lipiden in granulocyten en monocyt en terwijl lymfocyten en lymfoblasten niet door SBB worden gekleurd.

C. De Periodic Acid Schiff (PAS) kleuring; glycol en mucopolysacchariden in het celcytoplasma worden aangetoond door PAS-kleuring. Lymfoblasten worden het best aangetoond hiermee. Myeloïde of monocytoïde blasten geven een zwakke reactie of zijn negatief.

D. De Specific Esterase (Naphtol AS-D chloroacetaat esterase, ChlorE) kleuring; ChlorE is specifiek voor cellen van de neutrofielenreeks. ChlorE-activiteit komt niet of weinig voor in eosinofielen-, basofielen-, monocyt en lymfocytenreeks.

2. Voor differentiatie van cellen van de monocyt reeks

De non-specific esterase (alpha naphthyl acetaat esterase, ANAE); alpha naphthyl acetaat esterase komt in grote mate voor in monocyt en minder in neutrofielen en lymfocyten en wordt derhalve gebruikt om cellen van de monocyt reeks aan te tonen.

3.4 Analyse en validatie

Analyse

Voor het onderscheiden van leukemieën worden er drie morfologische methoden parallel toegepast:

1. De perifere differentiatie
2. De beenmergdifferentiatie
3. De cytochemische differentiatie

Ad 1. De perifere differentiatie

Van het bloedmonster wordt een bloedfilmpje (uitstrijkje) gemaakt en gekleurd volgens de MAY-Grunwald-Giemsa werkvoorschriften en microscopisch beoordeeld. De morfologie van de verschillende bloedcellen (bloedplaatjes of trombocyten, rode bloedcellen of erythrocyten en witte bloedcellen of leucocyten) wordt beoordeeld volgens standaarden met 100 x lensvergroting met olie-immersie. In de perifere differentiële telling worden er 100 cellen geteld en in percentage of absolute aantallen weergegeven. Een normale differentiatie bestaat uit uitgerijpte cellen. In tabel 3, blz.31 is er een weergave van een normaal bloedbeeld.

Tabel 3 Referentiewaarden bij een perifeer differentiële telling

Celsoort	Normaalwaarden (%)
Blasten (voorlopercellen)	0
Basofielen	1
Eosinofielen	1-6
Metamyelocyten	0
Staafkernigen (Neutrofielen)	0-4
Segmentkernigen (Neutrofielen)	40-75
Lymfocyten	20-45
Monocyten	2-10

Bron: Laboratorium Diakonessenhuis Paramaribo

Zoals in hoofdstuk 2.2 vermeld is, is er sprake van acute leukemie indien er $\geq 20\%$ blasten voorkomen in het bloed en of het beenmerg.

Ad 2. De beenmergdifferentiatie

Het beenmergpreparaat wordt eveneens volgens de Giemsa techniek gekleurd. Voor de telling wordt er een gedeelte van het preparaat gekozen waar de cellen los van elkaar liggen zo dicht mogelijk bij het zogenaamde mergbrokje. Er wordt van 300 cellen de morfologie beoordeeld en gedifferentieerd met een objectief van 100x met olie-immersie. Tabel 4 geeft een weergave van de referentiewaarden van de beenmergdifferentiatie.

Tabel 4 Referentiewaarden beenmergdifferentiatie

Celsoort	Normaalwaarden (%)
Blasten	0.3 – 2.9
Promyelocyten	1.7 – 8.4
Myelocyten	3.3 – 12.0
Metamyelocyten	3.1 – 10.7
Neutrofiele staafkernigen	5.4 – 16.2
Neutrofiele segmentkernigen	15.1 – 35.0
Eosinofielen en voorlopers	1.0 – 6.3
Basofielen en voorlopers	0.0 – 0.6
Lymfocyten	6.9 – 24.5
(pro-) Monocyten	0.4 – 5.2
Macrofagen	0.0 – 1.3
Plasmocyten	0.0 – 2.7
Vroege erytroblasten	1.1 – 4.0
Late erytroblasten	15.0 – 35.5

Bron: http://w1.uzleuven.be/labo/Leermodule/HEMATO_ATLAS/pagina_extra/beenmerg_algemeen_overzicht_blauw.htm

Ad 3.De cytochemische differentiatie

De kleuringen geschieden volgens werkvoorschriften van Sigma-Aldrich, procedure No. 391 (MPO), No. 380 (SBB), No. 91 (ChlorE en ANAE) en No. 395 (PAS) www.sigma-aldrich.com.

Naarmate voorlopercellen van de hematopoëse differentiëren en uitrijpen nemen de enzymactiviteiten, lipiden en ander chemische bestanddelen toe, of af in de verschillende cellijnen. De cytochemische reacties in de verschillende cellen worden beoordeeld met een rating. Dit is weergegeven in tabel 5. De cytochemische reacties in normale bloedcellen en hun voorlopers zijn opgenomen in tabel 6 op blz.33.

Tabel 5 Cytochemische scoring van de cellen en interpretatie

Cel rating	Intensiteit van de kleuring	Interpretatie
0	Geen kleuring	-
1+	Zwak tot matig/weinig Positieve cellen	±
2+	Matig tot sterk	+
3+	Sterk	+
4+	Briljant	+

Tabel 6 Verwachte cytochemische reacties in normale bloedcellen en blasten van acute leukemieën

Leukemiecellen	MPO/SBB	ChlorE	ANAE	PAS
Stamcellen (AUL)	-	-	-	-
Myeloblasten (AML)	+/++	+/++	-	-/±
Promyelocyten (PML)	+/++	+/++	-/±	±/+
Neutrofielen	++	+/++	-/±	+++
Myelo- monoblasten (AMML)	-/++	±/+++	+/+++	-/++
Monoblasten	+	-/±	+++	-/+
Monocyten (AMoL)	-/±	-/±	+++	±
Erytroblasten	-	-	-/±	-
Megakaryocyten	-	-	+++	++
Lymfoblasten (ALL)	-	-	-/+	+/++
Lymfocyten	-	-/±	-/±	-

Bron: Hoffmann et al.; KCL Speciale Hematologie, 2000 SOP nr.KL/SPHT/AN.021

Validatie

Voor de validatie van de methode zijn, over een periode van 12 maanden, 20 preparaten verzameld. Preparaten die tot een week voor aanvang van de kleurprocessen zijn verzameld, werden ingevroren, na fixatie in formaldehydedampen en methanol. Deze preparaten zijn bewaard in de diepvries (-10 to -20 °C). Preparaten die verzameld waren, een week voor aanvang en tijdens de uitvoering van de kleurprocessen, werden na fixatie bewaard bij kamertemperatuur. Elke serie kleuringen bestond uit een positieve en een negatieve controle en de te onderzoeken monsters van interesse. Als controles werden gebruikt, geselecteerde monsters van klinisch “gezonde” patiënten. Een positieve controle werd gekozen met een zodanige verdeling van cellen, dat de drie cellijnen (lymfocyten, neutrofielen en monocyten) goed vertegenwoordigd zijn (vb. resp. 50%, 25%, 25%). Een negatieve controle hield in een verhouding van bijvoorbeeld resp. 75%, 15% en 10%.

De kleuringen werden uitgevoerd bij kamertemperatuur en telkens één kleuringsmethode per keer. Duur van de kleuringsprocessen, varieerde van 20-45 minuten per kleuringstechniek. In bijlage 5 en 6 is een overzicht van de reproduceerbaarheid van de kwaliteitscontroles opgenomen.

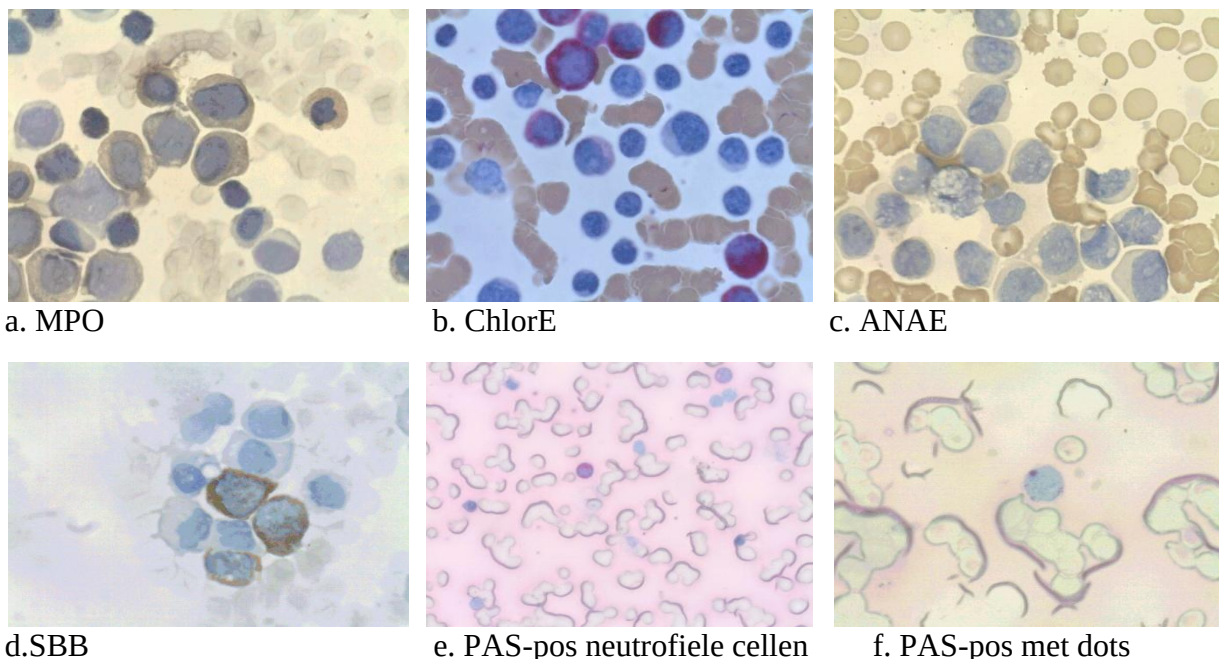
3.5 Resultaten

Marktonderzoek PA-laboratorium

Marktonderzoek op het PA-lab wijst uit dat jaarlijks gemiddeld 85 beenmergonderzoeken worden verricht. Minimaal 29-30 van deze aanvragen betreffen chronische en acute leukemie (van de witte bloedcellen). Het aantal BM dat ongeschikt wordt bevonden (niet-representatief) dus geen uitslag, bedraagt ca. 15%. Tussen 2008 en 2011 zijn er via het Pathologisch-Anatomisch Laboratorium in Suriname 336 aanvragen voor beenmergonderzoek behandeld. 69 leukemieën zijn hieruit geïdentificeerd. 34 gevallen wijzen op acute leukemieën. Van 19 gevallen kon niet uitgemaakt worden of het ALL, AML of MDS waren (zie bijlage I).

Cytochemische kleuringen

In de cytochemische reactie betekent een negatieve reactie dat er geen enzymen, lipiden, esterase of glycol activiteit aantoonbaar is. Een positieve reactie betekent dat er wel activiteit aanwezig is. Zie beelden van de cytochemische kleuringuitslag in onderstaande figuur. In tabel 7, blz. 36 zijn de cytochemische beoordeling van 7 casussen opgenomen.



Figuur 5. Enkele voorbeelden van cytochemische reacties van de uitgevoerde kleuringen.

Fig.5a MPO-zwak positief gekleurde blasten; sommige blasten zijn inert voor MPO-kleuring; fig.5b ChlorE- pos, zwak positieve en negatieve cellen. Fig. 5c ANAE zwak positief gekleurde blasten. Fig. 5d SBB positief en negatief gekleurde cellen. Fig.5 e; PAS-positieve (neutrofielen) en PAS-negatieve (lymfocyten). Fig 5f PAS-positieve cel met dots (karakteristisch voor lymfoblast)

Tabel 7 Cytochemische beoordeling van zeven geselecteerde casussen acute leukemieën

Casus	Perifere telling 100 %	Uitspraak diff	MPO	SBB	ChlorE	ANAE	PAS	Cytoch. beeld passend bij	Uitspraak behandelaar
1	BL 45 Ly 51 Sgm3 Mo 1	Acute Leukemie	-	-	-	-	±	ALL	ALL
2	BL 5 Mo66 Ly 11 Sgm15 Prom1 Mye 2	AMol?	-	-	-	± (mono)	±	CMol	Geen leukemie
3	BL 89 Mye1 Meta1 Sgm 6 St1 Ly 2	Acute Leukemie	-	-	-	-	-	AUL	Precursor T-cell ALL/ lymfoblastair lymfoom
4	BL 18 Promo78 Ly2 Sgm2	AMoL?	Geen prep	-	±	+	Geen prep	AMol	AML
5	BL66 Ly28 Mye1 Mo 2 St 1 Sgm 1	Acute Leukemie	-	-	-	-	+	ALL	ALL
6	Ly 81 (Atyp) Sgm 15 Mo3 Mye1	Lymfoom /CLL?	-	-	-	-	+	Geen uitspraak	CLL
7	BL71 (mye-monobl?) Mye 9 Mo 11 Prom2 Meta2 Ly5	Acute Leukemie	±	±	±	±	-	AMML	†

BL=blast; Prom= promyelocyt; Mye= myelocyt; Meta= metamyelocyt, St= staafkernige; Sgm= segmentkernige; Ly= lymfocyt; Mo= monocyten; Promo= promonocyt; atyp= atypisch; ALL= acute lymfoblasten leukemie, CMoL= chronisch monocyten leukemie; AUL= acute undifferentiated leukemie; AMol= acute monocyten leukemie; AMML= acute myelomonoblasten leukemie. †= patient overleden voor diagnose.

Analyse van de casussen

In de hierna volgende voorbeelden worden 4 casussen uit tabel 7 geanalyseerd. Voor gedetailleerde cytochemische reacties van alle geselecteerde casussen wordt verwezen naar bijlage 7.

Casus 1

In de perifere telling is gedifferentieerd: 45 blasten, 51 lymfocyten, 3 segmentkernigen en 1 monocyt. De meest waarschijnlijke conclusies die getrokken kunnen worden, zijn:

MPO: 2% van de cellen is 3+ gekleurd; dit vertegenwoordigt de 3 segmenten in de perifere telling. 98% van de cellen is negatief gekleurd en pleit dus voor de 51 lymfocyten (lymfo), 45blasten en 1 monocyt (mono). Conclusie: de blasten zijn **MPO –**

SBB: 1% van de cellen is 2+ gekleurd; dit vertegenwoordigt de 3 segmenten in de perifere telling. 99% van de cellen is negatief gekleurd en vertegenwoordigt eveneens de 51 lymfo's, de 45 blasten en 1 mono. Conclusie: de blasten zijn **SBB-**

ChlorE: 4% van de cellen kleurt 3+; dit vertegenwoordigt de 3 segmenten. 96% is negatief gekleurd; vertegenwoordigt eveneens de 51 lymfo's, 45 blasten en 1 mono. Conclusie: de blasten zijn **ChlorE-**

ANAE: 2% van de cellen is 1+ gekleurd. 98% van de cellen is negatief gekleurd. Conclusie: de blasten zijn **ANAE-**.

PAS: 10% mononucleaire cellen is 2+ gekleurd met *dots*, karakteristiek voor lymfoblasten. 2% van de mononucleaire cellen is 1+ gekleurden pleit eveneens voor de blasten, maar ook voor monocyt. 86% van de cellen is negatief gekleurd waaronder ook de blasten. Op basis van de 10-12% positieve cellen kan geconcludeerd worden: de blasten zijn **PAS ±**

Laboratoriumuitspraak: een cytochemisch beeld passend bij ALL

De diagnose van de behandelaar luidt: ALL

De cytochemische waarde bij deze case is een bevestiging van het klinische beeld.

Casus 4

Opmerking: van deze casus waren er slechts 3 preparaten beschikbaar.

De perifere differentiatie is: 18 blasten, 78 promonocyten, 2 lymfocyten en 2 segmenten. De meest waarschijnlijke conclusies uit de cytochemie zijn:

SBB: 2% van de cellen is 2+ en vertegenwoordigt de segmenten. 98% van de cellen daarentegen is negatief gekleurd en pleit voor de overige cellen. Conclusie: de blasten zijn **SBB -**.

ChlorE: 1% van de cellen is 3+ gekleurd en 1% is 2+; deze vertegenwoordigen de 2% segmenten in de perifere differentiatie. 92% van de cellen is 1+ gekleurd; dit pleit voor cellen van de monocytensreeks en vertegenwoordigt de promonocyten en de blasten. Conclusie: de blasten zijn **ChlorE±**.

ANAE: 98% van de cellen is 1+ tot 3+ gekleurd; vertegenwoordiging van cellen van de monocytensreeks en betreft de promonocyten en de blasten. Conclusie: de blasten zijn **ANAE +**.

Laboratoriumuitspraak: een cytochemisch beeld passend bij AMoL.

De diagnose volgens de behandelaar luidt: AML

De cytochemie-uitslag wijst meer naar de monocytens cellijn van AML. Dit biedt mogelijkheid voor een gerichtere aanpak voor de therapie.

Casus 5

De perifere differentiatie is: 66 blasten, 28 lymfo, 2 mono, 1 myelocyt, 1 staafkernige, 2 segmentkernigen. De meest waarschijnlijke conclusies uit de cytochemie zijn:

MPO: 4% van de cellen is 2+ gekleurd; dit vertegenwoordigt de myelocyt, de staaf- en de segmentkernigen. 96% van de cellen kleurt negatief; dit vertegenwoordigt de monocytens, de lymfocyten en de blasten. Conclusie: de blasten zijn **MPO-**.

SBB: 2% van de cellen is 1+ gekleurd; dit vertegenwoordigt de monocytens, de myelocyt, de staaf- en segmentkernigen. 1% van de cellen is 2+ gekleurd; dit vertegenwoordigt de myelocyt, de staafkernige of de segmentkernigen. 97% van de cellen is negatief gekleurd; dit vertegenwoordigt de blasten de lymfocyten en de monocytens. Conclusie: de blasten zijn **SBB-**

ChlorE: 3% van de cellen is 1+ gekleurd; vertegenwoordigt de monocyt. 2% v/d cellen is 2+ gekleurd en vertegenwoordigt de myelocyt de staaf- en segmentkernigen. 95% van de cellen is negatief gekleurd; een vertegenwoordiging van de blasten en de lymfocyten.

Conclusie: de blasten zijn **ChlorE-**

ANAE: 2% van de cellen is 3+ gekleurd; vertegenwoordigt de monocyt 98% is negatief gekleurd en vertegenwoordigt de blasten, de lymfocyten, de myelocyt, de staaf-en segmentkernigen. Conclusie: de blasten zijn **ANAE-**

PAS: 1% van de cellen is 2+; dit vertegenwoordigt de staafkernigen. 1% v/d cellen is 3+ en vertegenwoordigt de segmentkernigen. 56% mononucleaire cellen is 2+ gekleurd, waarvan vele met de karakteristieke *dots*; deze pleiten voor de blasten. 42% van de cellen is negatief gekleurd en pleit voor de lymfocyten, de myelocyt, de monocyt en een deel (10%) van de blasten. Conclusie: de blasten zijn **PAS +**

Laboratoriumuitspraak: een cytochemisch beeld passend bij ALL

De diagnose van de behandelaar luidt: ALL

De cytochemische waarde bij deze case is een bevestiging van het klinische beeld.

Casus 7

De perifere differentiatie geeft de volgende uitslagen; 71 blasten (myelo-mono?), 9 myelocyten, 11 monocyt, 2 promyelocyten, 2 metamyelocyten, 5 lymfocyten. De meest waarschijnlijke conclusies uit de cytochemische differentiatie zijn:

MPO: 15% van de cellen is 1+ gekleurd; pleitend voor de monocyt en de blasten (myelo-mono). 15% is 2+ gekleurd; pleitend voor de blasten, promyelocyten, myelocyten en metamyelocyten. 21% is 3+ gekleurd; pleitend eveneens voor de blasten, de promyelocyten de myelocyten en de metamyelocyten. 49% van de cellen is negatief gekleurd, waaronder ook blasten. Dit percentage vertegenwoordigt de lymfocyten en ca. 21% van de blasten. Conclusie: de blasten zijn **MPO±**.

SBB: 10% van de cellen is 1+ gekleurd; pleitend voor de monocyt en de blasten (myelo-mono). 19% van de cellen is 2+ gekleurd, pleitend voor de blasten, promyelocyten, myelocyten en metamyelocyten. 33% van de cellen is 3+ gekleurd, eveneens pleitend voor de blasten, promyelocyten, myelocyten en metamyelocyten. 38% van de cellen is negatief

gekleurd, waaronder ook blasten. Dit percentage vertegenwoordigt de lymfocyten en 10% van de blasten. Conclusie: de blasten zijn **SBB±**.

ChlorE: 55% van de cellen is 1+ gekleurd, waaronder 17% blasten en de rest (38%); dit percentage vertegenwoordigt cellen van de monocyteneeks. 4% van de cellen is 2+ gekleurd; een vertegenwoordiging van zowel de monocytene- als de neutrofieleneeks. 13% van de cellen is 3+ gekleurd; dit pleit voor cellen van de neutrofieleneeks. 28% van de cellen is negatief gekleurd; dit pleit voor de monocytene en de lymfocyten. Conclusie: de blasten zijn **ChlorE ±**.

ANAE: 4% van de cellen is 3+ gekleurd; een vertegenwoordiging van de monocytene. 93 % van de cellen is 1+ gekleurd; dit vertegenwoordigt zowel de neutrofielene als de monocytene en de lymfocytenreeks, waaronder ook de blasten. Conclusie de blasten zijn **ANAE±**

PAS: 29% van de cellen is 1+ gekleurd; vertegenwoordiging van de monocytene, de promyelocyten, de myelocyten de metamyelocyten en de lymfocyten. 71% van de cellen is negatief gekleurd en vertegenwoordigt de blasten. Conclusie: de blasten zijn **PAS-**

Laboratoriumuitspraak: een cytochemisch beeld passend bij AMML

Opmerkingen bij casus 2, 3 en 6

Het cytochemisch beeld van casus 2 past mogelijk bij een chronische monocyteneukemie (CMoL). Volgens de behandelaar was er geen diagnose van leukemie gesteld. Een waarschijnlijke verklaring voor dit geval is; één of ander ziektebeeld, dat een infectie zou kunnen zijn, heeft een verhoging van de monocytene teweeggebracht, die na behandeling is verholpen.

Casus 3 geeft een cytochemisch beeld passend bij AUL. De diagnose volgens de behandelaar is; Precursor T-cel ALL/ lymfoblastair lymfoom. In deze casus zou met flowcytometrie de immunofenotype bepaald moeten worden voor specificatie. Dit geldt eveneens voor casus 6.

3.6 Kostencalculatie

Uitgaande van 10 monsters in het eerste jaar, wordt verwacht dat in het tweede t/m het vijfde jaar het aantal monsters steeds met gemiddeld 10 (jaarlijkse incidentie PA-lab) zal toenemen. Het is verwachtbaar dat in een periode van vijf jaar (= 5 jaar *event-free* of overlevingsperiode) er controle op de therapie wordt gedaan.

In het eerste en tweede jaar wordt aangenomen dat er 1 monster per keer wordt gekleurd. Het aantal preparaten per keer bedraagt dan 3 voor het monster en 6 controles voor 3 kleuringen (SBB, PAS en eventueel ChlorE of ANAE). Uit een kit reagens kunnen er 10 series kleuringen uitgevoerd worden. Voor 10 monsters (drie maal 1 kit reagens) worden er totaal 90 preparaten microscopisch beoordeeld. Indien elk preparaat gemiddeld 15 minuten wordt beoordeeld, is de tijd voor 90 preparaten: $90 \times 15 \text{ min.} = 1350 \text{ minuten}$ (22 en een halve uren). Naarmate het aantal monsters dat per keer gekleurd wordt toeneemt, wordt het aantal controles minder. De pre- en postanalysetijd is gemiddeld 2 uur per monster (20 uren voor 10 monsters). De kosten voor microscoopgebruik voor 90 preparaten zijn 0.09 USD. Tabel 8 geeft de kostprijsberekening weer van de cytochemische testen (zie ook bijlage VIII).

Tabel 8 Kostencalculatie en kostprijsberekening cytochemische testen

Benodigdheden (3 x 1 kit à 10 series kleuringen)	Kosten in \$(USD)
Reagentia (SBB, PAS, ChlorE)	487.50
Verbruiksartikelen	46.00
Administratie/Overheadkosten	28.60
Personeelskosten (43 uren)	191.00
Elektriciteit	0.09
Water	0.08
Totaal	753.27
Kostprijs voor een pakket bestaande uit 3 testen= 75 \$ / patiënt	

4 Discussie, conclusie en aanbevelingen

Discussie

Het percentage BM dat ongeschikt (niet-representatief) wordt bevonden, dus geen uitslag en de niet-gespecificeerde leukemieën, kan met cytochemische kleuringen aanzienlijk verminderd worden. In de praktijk is gebleken dat de intensiteit van de MPO-kleuring zwakker is dan de SBB. Tevens is de SBB-kleuring qua uitvoering simpeler dan de MPO. Er bleek tevens een verschil te zijn in de intensiteit van de preparaten die ingevroren waren en de vijf preparaten die tijdens de uitvoering van de kleuringen vers gemaakt en gekleurd zijn. Dit kan komen doordat de bewaarcondities niet altijd optimaal waren door herhaaldelijk ontdooien van de diepvries. De kwaliteitscontroles zijn volgens verwachting uitgekomen.

De kostencalculatie wijst uit dat voor de kostprijs van 75\$ in het vierde jaar winst geboekt wordt, welke in het vijfde jaar zelfs vier tot vijf maal zal zijn.

Door de voortschrijdende ontwikkeling in de moleculaire diagnostiek wordt steeds meer gebruikgemaakt van deze techniek voor subclassificatie van acute leukemie. De FAB-subclassificatie voor ALL is niet langer geldig. Met de moleculaire analyses worden er steeds meer genmutaties bekend die invloed hebben op de prognose. Hiermee is een gespecialiseerde behandeling voor de subtypes steeds meer mogelijk. Onderzoek moet komen onder de behandelaars over de behandelingsmethoden. Dit vereist dat er in de toekomst toch gewerkt moet worden naar het beschikken over modernere technieken voor de diagnostiek van acute leukemie in Suriname. Echter de moleculaire diagnostiek gebruikt zeer geavanceerde technieken. Door de kleine bevolking zijn deze technieken niet altijd rendabel voor een ontwikkelingsland als Suriname. Tevens moet er voor deze technieken, m.n. in de hematologie, expertise aanwezig zijn. Suriname beschikt niet over een hematoloog, die zich gespecialiseerd heeft op dit gebied. Het zou misschien gewenst zijn om discussie over DNA en immunofenotypering op gang te brengen. Het voordeel van immunofenotypering is, dat zij specifiek is. Een gangbare methode is de flowcytometer waarmee de subtypes van ALL bepaald kunnen worden. Tevens is het mogelijk om lymfomen (weefselkanker) hiermee te identificeren. Met tussenkomst van het ministerie van Volksgezondheid zouden er mogelijkheden bekeken moeten worden om één laboratorium te accommoderen voor de

aanschaf van de apparatuur en een intensieve training van meerdere personen in het buitenland voor nog meer expertise.

Conclusie

Voor onderscheid tussen AML en ALL lijkt de cytochemische kleuring zeker haalbaar. Zoals eerder gesteld, worden deze kleuringen nog niet in Suriname uitgevoerd en de introductie hiervan zou de gezondheidszorg in Suriname ten goede komen. Niet alleen het Diakonessenhuis, maar ook andere instellingen zouden gebruik kunnen maken van deze diensten. Diakonessenhuis heeft de expertise om te implementeren.

De implementatie omvat dus de volgende kleuringen:

1. de Sudan Black B (SBB), de Naphtol AS-D chloro-acetaat esterase (ChlorE) en de Periodic-Acid-Schiff (PAS);
2. in twijfelgevallen, ook de Myeloperoxidase (MPO) en de Alpha naphthyl acetaat esterase (ANAE) kleuring; voor aantonen van cellen van de granulocyten- en de monocytene reeks.

Aanbevelingen

Voor een efficiënte en accurate manier van dienstverlening, verdient het aanbeveling om de drie indicatoren, morfologie, cytochemie, immunofenotypering, voor de identificatie van acute leukemieën te concentreren binnen één instelling. Het Diakonessenhuis heeft voor alle drie indicatoren, de expertise in huis.

Aan de directie van het Diakonessenhuis wordt aanbevolen om cytochemie op te nemen in het dienstenpakket en dit door te geven aan de andere ziekenhuizen. Tevens het voortouw te nemen in de discussie met het ministerie van Volksgezondheid en mogelijkheden te bekijken voor aanschaf van een flowcytometer ter introductie van immunofenotypering in Suriname.

Literatuurlijst

1. Addison G.M., Biondi A., Cazzaniga G., Daniotti M., Eden O.B., Greaves M.F., Masera G., Saha V., & Wiemels J.L.,(1999). *Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children*. The Lancet.Vol.354.
2. Akagi Tadayuki, Kato Motohiro, Kawamata Norihiko, Koeffler H. Phillip, Der-Cherng Liang, Miller Carl W., Ogawa Seishi, Okamoto Ryoko, Lee-Yung Shih Masashi Sanada, & Yamamoto Go, (2009). *Hidden abnormalities and novel classification of t(15;17) acute promyelocytic leukemia (APL) based on genomic alterations*. Blood, 19 Februari _ Volume 113, Number 8: The American Society of Hematology
3. American Cancer Society, (2010). *Leukemia-- Acute Myeloid(myelogenous);paragraaf "How is acute myeloid leukemia classified?"*
<http://www.cancer.org/Cancer/Leukemia-AcuteMyeloidAML/DetailedGuide/leukemia-acute-myeloid-myelogenous-classified>.
merican Cancer Society.
4. Bennett John M. & Orazi Attilio, (2008). *Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: recommendations for a standardized approach*. 2009 Ferrata Storti Foundation.
5. Bureau voor Openbare Gezondheidszorg (2011). Doodsoorzaken in Suriname 2008-2009. afdeling Epidemiologie. <http://www.bogsur.sr/downloads/Mortaliteit%202008-2009DEF%20%28Autosaved%29%20%28Autosaved%29.pdf> download mei 2012.
6. Carroll William Larkin & Finlay Jonathan L., (2010). *Cancer in Children and Adolescent); Pathological evaluation of childhood cancer (chapter 5, p.61)*.Canada: Jones and Bartlett.

7. Hee Young Chung, M.D., Kyung-Hee Kim, M.D., Kyung Ran Jun, M.D., Seongsoo Jang, M.D., Chan-Jeoung Park, M.D. Hyun-Sook Chi, M.D., Ho Joon Im, M.D., Jong Jin Seo, M.D., and Eul-Ju Seo, M.D, (2010). *Prognostic significance of TEL/AML1 rearrangement and its additional genetic changes in Korean childhood precursor B-acute lymphoblastic leukemia*. Korean J Lab Med 2010;30:1-8), Abstract.
8. Esparza Samuel D., MD, & Sakamoto Kathleen M., MD, PhD. *Acute Lymphoblastic Leukemia: Pathophysiology*. Medscape General Medicine. 2005;7(1):23 © 2005 Medscape.
9. Estey E.H, (2012). *Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management*. Division of Hematology, University of Washington, USA. : © 2011 Wiley Periodicals, Inc.
10. Hoffbrand A.V., Moss P.A.H., Pettit J.E., (2001). *Essential Haematology* (fourth edition). Oxford: Blackwell Science Ltd.
11. Hoffmann J.J.M.L., Akkerman J.W.N., Nieuwenhuis H.K., Overbeeke M.A.M., (2007). *Hematologie* (tweede druk, tweede oplage). Arnhem: Syntax Media.
12. Mazouni C., Fina F., Romain S., Ouafik L., Bonnier P., Brandone J.M. & Martin P.M., (2010). *Epstein-Barr virus as a marker of biological aggressiveness in breast cancer*. British Journal of Cancer (2011) 104, 332–337. doi:10.1038/sj.bjc.6606048 www.bjcancer.com Published online 21 december 2010.
13. McGlaufflin Shannon, Munger Jolene & Nelson Rebecca, (2005). *The mystery of childhood leukemia: An evolutionary approach* <http://rebeccanelson.com/leukemia/history.html>
14. Pakakasama S., Kajanachumpol S., Kanjanapongkul S., Sirachainan N., Meekaewkunchorn A., Ningsanond V., Hongeng S. *Simple multiplex RT-PCR for identifying common fusion transcripts in childhood acute leukemia*. Department of Pediatrics and Research Center, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Bangkok,

- Thailand. rasam@mahidol.ac.th Int J Lab Hematol. 2008 Aug;30(4):286-91. Download mei 2012.
15. <http://www.med-ed.virginia.edu/courses/path/innes/wcd/cyto.cfm>. "Leukemia: laboratory evaluation – cytochemistry". Download mei 2012.
16. Schumacher Harold R., M.D., (1990). *Acute Leukemia; Approach to diagnosis*. Tokyo: IGAKU-SHOIN Ltd.
17. Universitair Medisch Centrum Groningen (UMCG), 2003. (laatste herziening 23-03-2011). *Acute leukemie: diagnostiek en algemene maatregelen van behandeling*. <http://www.hematologiegroningen.nl/protocollen/index2.htm>
18. UZ Leuven. *Normalewaardenbeenmerg*.
http://w1.uzleuven.be/labo/Leermodule/HEMATO_ATLAS/pagina_extra/beenmerg_a_lgemeen_overzicht_blauw.htm. download 16-10-2012.
19. Vardiman James W., Thiele Jüergen, Arber Daniel A., Brunning Richard D., Borowitz Michael J., Porwit Anna, Harris Nancy Lee, Le Beau Michelle M., Hellström-Lindberg Eva , Tefferi Ayelew, Bloomfield Clara D., (2009). *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*: The American Society of Hematology.
20. Wynendaele Femke, (2008-2009). *Klinische relevantie van nieuwe prognostische markers voor pediatrische acute lymfatische leukemie*. http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/391/963/RUG01-01391963_2010_0001_AC.pdf. mei 2012.
21. Berendes Paulus Benjamin, (1997). *Recognition of tumor-specific proteins in human cancer*. http://repub.eur.nl/res/pub/18151/970604_BERENDES,%20Paulus%20Benjamin.pdf download sept. 2012

Bijlagenlijst

Bijlage I Marktonderzoek aantal beenmerg- en leukemieaanvragen	48
Bijlage II Differentiatieschema van de hematopoëse	49
Bijlage III Differentiatieschema B- en T-cel met CD-markers	50
Bijlage IV De FAB-classificatie van AML	51
Bijlage V Kwaliteitscontrole cytochemische kleuring	52
Bijlage VI Vervolg kwaliteitscontrole cytochemische kleuring	53
Bijlage VII Cytochemische scores van de geselecteerde casussen	54
Bijlage VIII Kostenberekening cytochemische bepalingen	55

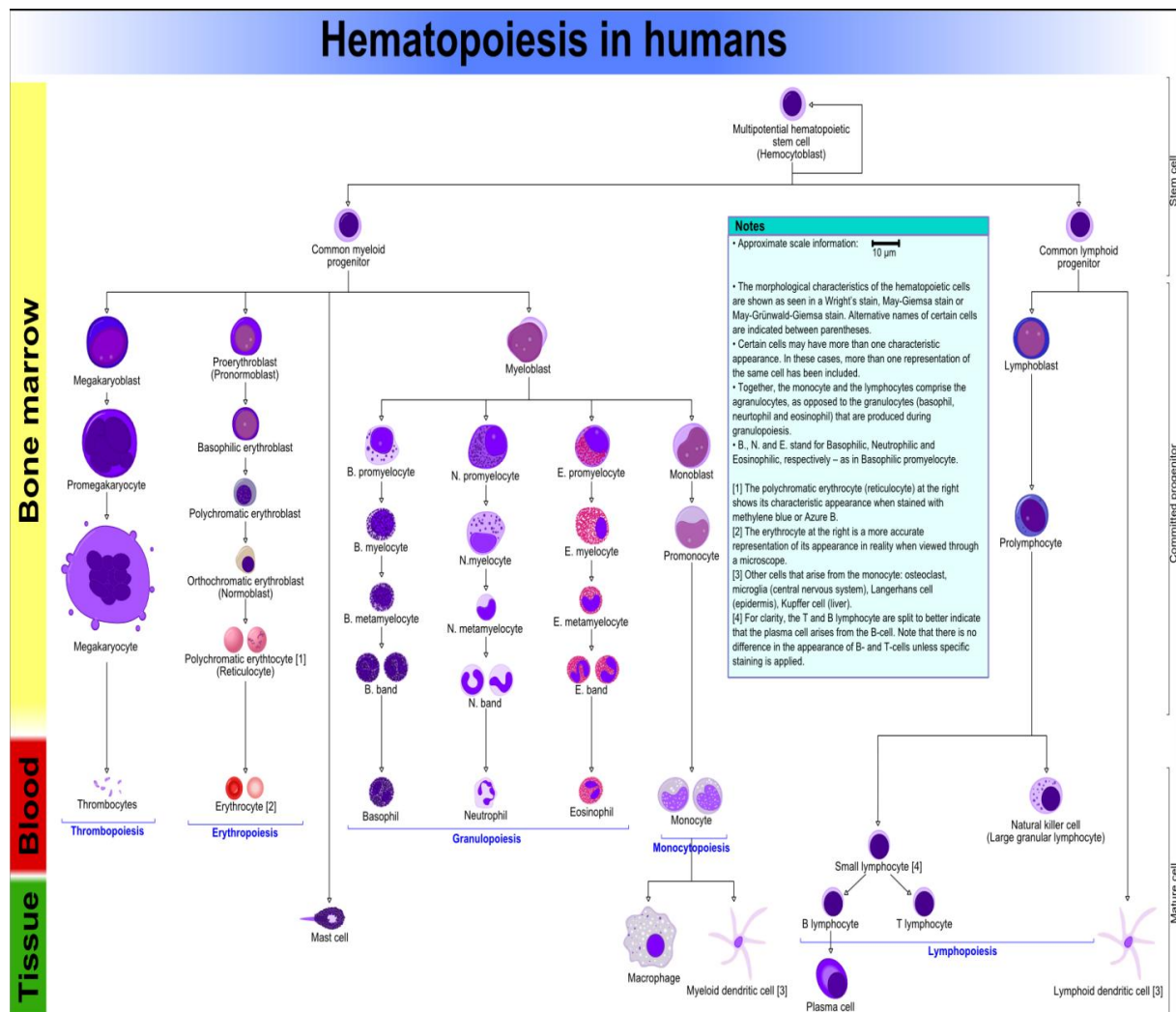
Bijlage I Marktonderzoek aantal beenmerg- en leukemieaanvragen

Tabel 9 Aantal beenmergonderzoekaanvragen en uitslagen op het PA-lab tussen 2008-2011

Beenmergonderzoekaanvragen								
Jaar	Aantal BM onderzoek			Minimaal specifieke aanvraag voor leukemie		Aantal niet-representatieve punctaat		
2008	85			30		14		
2009	88			29		10		
2010	84			30		14		
2011	79			24		23		
Gemiddeld	84			29				
Beenmergaspiraattuitslagen								
Jaar	ALL	AML	MDS	Niet gespecificeerd	Aantal acute leukemie	CLL	CML	Aantal leukemie
2008	3	4		1	7	1	4	13
2009	4	5	1	2	10	2	6	20
2010	6	4	3	8	13		2	23
2011	2	1	1	8	4	1		13
Totaal	15	14	5	19	34	4	12	69

Tussen 2008 en 2011 zijn er via het Pathologisch-Anatomisch Laboratorium in Suriname 336 aanvragen voor beenmergonderzoek behandeld. Van dit aantal zijn minimaal 113 met een specifieke vraagstelling of aanwijzing voor leukemie. 69 leukemieën zijn hieruit geïdentificeerd. 34 gevallen wijzen op acute leukemieën. Van 19 gevallen kon niet uitgemaakt worden of het ALL, AML of MDS waren.

Bijlage II Differentiatieschema van de hematopoëse

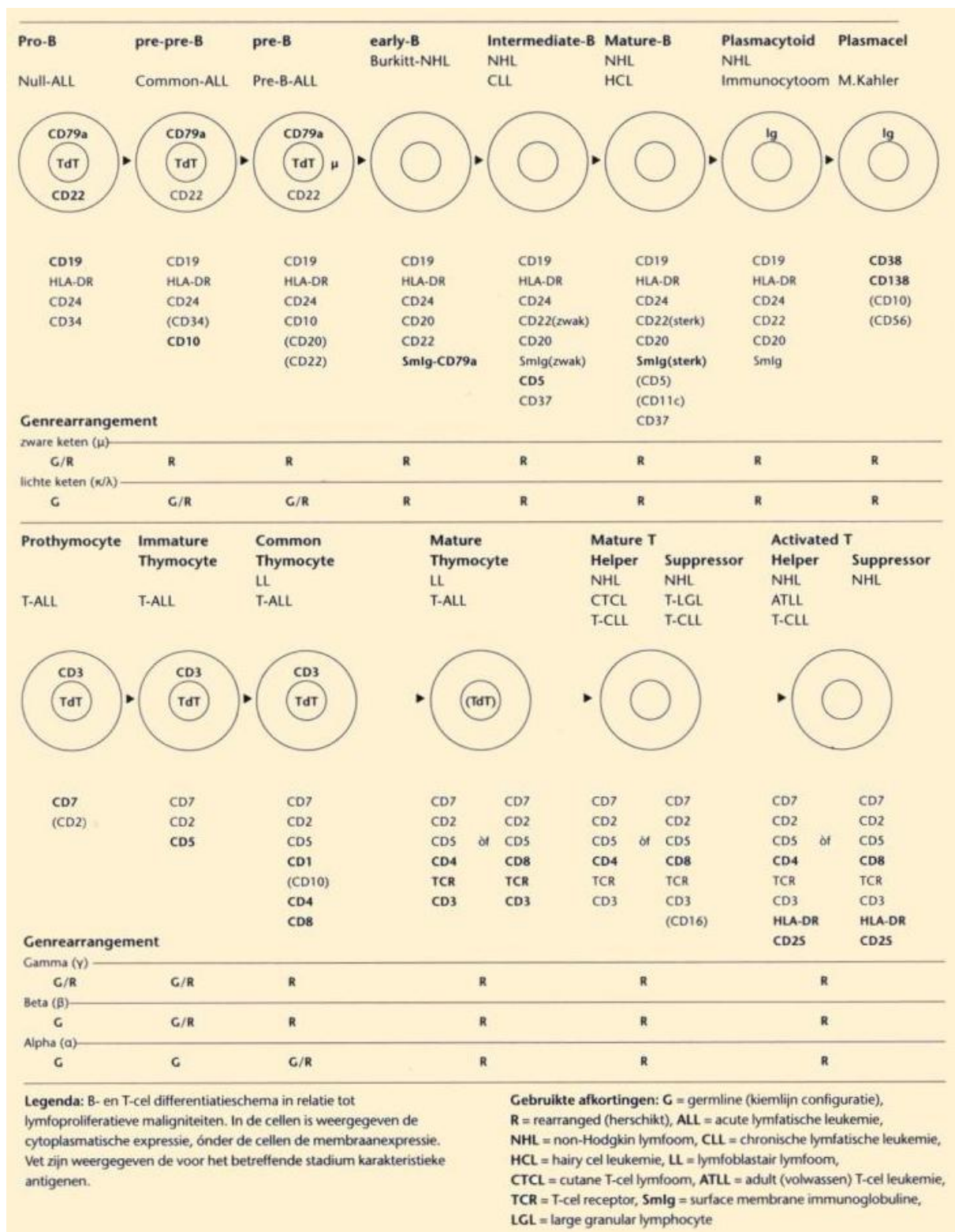


Figuur 6. Schema van de hematopoëse

Bron

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/69/Hematopoiesis %28human%29_diagram.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/69/Hematopoiesis_%28human%29_diagram.png) (15-4-2012)

Bijlage III Differentiatieschema B- en T-cel met CD-markers



Figuur 7. B- en T-cel differentiatieschema

Bron: [http://www.sanquin.nl/producten-](http://www.sanquin.nl/producten-diensten/diagnostiek/vademecum/theoriehoofdstukken/proliferatieve-bloedziekten/#Tabel%201)

[diensten/diagnostiek/vademecum/theoriehoofdstukken/proliferatieve-bloedziekten/#Tabel%201](http://www.sanquin.nl/producten-diensten/diagnostiek/vademecum/theoriehoofdstukken/proliferatieve-bloedziekten/#Tabel%201) 19-5-2012

Bijlage IV De FAB-classificatie van AML

FAB subtype	Name	% of adult AML patients	Prognosis compared to average for AML
M0	Undifferentiated acute myeloblastic leukemia	5%	Worse
M1	Acute myeloblastic leukemia with minimal maturation	15%	Average
M2	Acute myeloblastic leukemia with maturation	25%	Better
M3	Acute promyelocytic leukemia (APL)	10%	Best
M4	Acute myelomonocytic leukemia	20%	Average
M4 eos	Acute myelomonocytic leukemia with eosinophilia	5%	Better
M5	Acute monocytic leukemia	10%	Average
M6	Acute erythroid leukemia	5%	Worse
M7	Acute megakaryoblastic leukemia	5%	Wors

Bron: Bennett et al., 2008

Bijlage V Kwaliteitscontrole cytochemische kleuring

Tabel 10A Reproduceerbaarheid van de kwaliteitscontrole

Kleuring-serie *	Differentiatie		MPO	SBB	ChlorE	ANAE	PAS
	Machine	Micros-coop					
2	Pos: Ly24% Ne46% Mo29% Rest 1%	16 57 27	59%+	mislukt	49%+	16%+	50%+
	Neg: Ly 70% Ne 26% Mo <5% Rest<5%	mislukt	23%+	21%+	19%+	mislukt	23%+
3	Pos: Ly22% Ne53% Mo 21% Rest 4%	10 64 16 10	mislukt	88%+	83%+	3+ Neg ctrl	87%+
	Neg: Ly40% Ne24% Mo26% Rest10%	45 26 21 8	57%+	53%+	64%+	24% Pos ctrl	62%+
4	Pos: Ly21%* Ne58% Mo21% Rest0%	18 47 23 11	81%+	73%+	70%+	24%+	72%+
	Neg: Ly66% Ne18% Mo11% Rest 5%	77 15 2 6	20%+	28%+	25%+	10%+	34%+
5	Pos: Ly37% Ne 57% Mo 5% Rest1%	40 57 3 0	59%+	65%+	51%+	3%+ Neg ctrl	60%
	Neg: Ly23% Ne42% Mo22% Rest15%	24 47 13 16	69%+	68%+	52%+	16%+ Pos ctrl	84%+

*Opm.: Meerdere preparaten uit de serie 1 kleuringen zijn mislukt en zijn derhalve weggelaten.

Bijlage VI Vervolg Kwaliteitscontrole cytochemische kleuring

Tabel 10B Vervolg Reproduceerbaarheid van de kwaliteitscontrole

Serie	Differentiatie		MPO	SBB	Chlor E	ANAE	PAS
	Machine	Microscoop					
6	Pos:Ly34% Ne44% Mo22% Rest0%	30 50 14 6	68%+	57%+	54%+	11%+ neg ctrl	mislukt
	Neg:Ly45% Ne33% Mo20% Rest2%	49 35 15 1					
7	Pos:Ly20% Ne42% Mo37% Rest1%	32 38 28 2	80%+	76%+	86%+	24%+	77%+
	Neg:Ly57% Ne26% Mo12% Rest5%	61 27 8 4	37%+	26%+	33%+	7%+	43%+
8	Pos:Ly30% Ne58% Mo11% Rest1%	42 55 3 0	64%+	64%+	44%+	1% (neg ctrl)	62%+
	Neg:Ly53% Ne25% Mo20% Rest2%	77 17 4 2	37%+	39%+	39%+	16%+ (13%lymfo±) Pos ctrl	49%+

Ly= lymfocyten; Ne= neutrofielen; Mo= monocyten; Pos= positieve controle; Neg= negatieve controle

 = leftgranulocyten en monocyten

 = betreft de monocyten

 = betreft neutrofielen en monocyten

 = betreft neutrofielen en lymfoblasten

Bijlage VII Cytochemische scores van de geïdentificeerde casussen

Tabel 11 Percentages cytochemische scores van de geselecteerde casussen acute leukemieën

Casus	Perifere Diff %	Percentage MPO score alle cellen	Percentage SBB score alle cellen	Percentage ChlorE score alle cellen	Percentage ANAE score alle cellen	Percentage PAS score alle cellen
1	BL45 Ly51 Sgm3 Mo 1	2%+++	1%+	4%+++	2%+	10%++ (dots), 2%+
2	BL5 Mo 66 Ly 11 Sgm 15 Mye 2 Promy1 Meta1	2%+++	1%++	3%+++ 7%++ 6%+	54%+	12%+++ 4%++ 22%+
3	BL 89 Mye1 Meta 1 Sgm 6 St 1 Ly 2	0	0	1%++	0	2%+++ 3%++
4	BL18 Promo 78 Ly 2 Sgm 2	Geen preparaat	2%++	1%+++ 1%++ 92%+	98%+ /+++	Geen preparaat
5	BL 66 Ly 28 Mye 1 Mo 2 St 1 Sgm 1	4%++	2%+ 1%++	3%+ 2%++	2%+++	1%++ 1%+++ 56%++ (dots)
6	Ly 81 (atp/BL?) Sgm 15 Mo 3 Mye 1	3%++ 14%+++	1%+ 1%++ 16%+++	3%+ 9%+++	5%+	14%+++ 48%+ 2%+ (dots)
7	BL71 Mye 9 Mo 11 Prom 2 Meta2	15%+ 15%++ 21%+++	10%+ 19%++ 33%+++	55%+ 4%++ 13%+++	93%+ 4%+++	29%+

Bijlage VIII Kostenrekening cytochemische bepalingen

Tabel 12 Kostenrekening uitgevoerde cytochemische testen en kostenberekening

Aantal monsters: 20 (5 testen)		Gemaakte kosten in USD (1\$= 3.50SRD)
Benodigdheden	Aantal	
Leukocyte peroxidase kit	1	186.50
Sudan Black B kit	1	179.50
Naphtol AS-D chloroacetate kit	1	144.00
A-Naphtyl Acetate Esterase kit	1	142.50
Periodic Acid-Schiff kit	1	164.00
Formaldehyde 37%	1 liter	17.71
Aceton	0.5 liter	12.05
Alcohol 96%	10 liters	17.10
Waterstofperoxide	0.5 liter	2.14
Pipetpipjes 1-200 µL	100 stuks	1.95
Pipetpipjes 200-1000 µL	150 stuks	3.40
Objectglazen (20 monsters + 80 controles)	400 stuks	34.29
Glaswerk	uit voorraad	
Aquadest	80 liters	114.29
Administratie kosten/ Overheadkosten		57.20
Totaal		1076.71
Kostprijs: totaal/ 20 monsters= 54 \$ per patiënt		

- Personeels-, elektriciteits- en waterverbruikskosten zijn gecalculeerd in de overheadkosten die als standaard worden gehanteerd binnen de instelling.