

Appendix richtlijn Mastocytose B:

Laboratoriumonderzoek anders dan pathologisch onderzoek.

Cytologie van bloed en beenmerg

In aanvulling op beoordeling van het beenmergbiopt dient beoordeling van de morfologie van de individuele cellen (cytologie) in bloed en een beenmergaspiraat plaats te vinden.

Afname

Voor hemocytometrie, differentiële telling en morfologische beoordeling van de bloedcellen dient EDTA-ontstold bloed te worden gebruikt.

Een beenmergaspiraat wordt verkregen middels een cristabiopsie. Bij een cristabiopsie wordt bij voorkeur eerst een aspiraatspuit gebruikt en pas daarna een biopt afgenomen. Bij afname van eerst een biopt of bij herhaalde afnames op dezelfde punctieplaats is er verhoogde kans op beschadiging van cellen met een minder betrouwbare morfologische beoordeling van de cytologie en op bloedbijmenging met verdunning van het beenmergaspiraat en daardoor een onjuiste differentiële telling van de cellen en procentueel verminderd aantal mestcellen. Eventueel kan bij afname van eerst een biopt of bij herhaalde afnames via dezelfde incisie onder een andere hoek op een afstand van 0,5-1 cm van de eerste punctieplaats een aspiraatspuit of tweede afname worden afgenomen (Lee et al., 2008).

Door bij afname gebruik te maken van een spuit/buis die reeds gevuld is met anticoagulans (EDTA voor morfologie, moleculaire diagnostiek en eventueel flowcytometrie en heparine voor flowcytometrie en karyotypering) en door direct naast het bed cytologiepreparaten (uitstrijken) te maken, worden respectievelijk snelle stolselvorming en het optreden van beschadiging van cellen voorkomen.

Beoordeling/test

In de cytologie dienen (subtiële) afwijkingen van de mestcellen (geringe spoelvorm, ontkorreling en/of atypie) beoordeeld te worden, waarbij naast de MGG (May-Grünwald Giemsa) of Wright kleuring de toluidine blauw kleuring niet mag ontbreken.

Ook voor beoordeling van aan- of afwezigheid van dysplasie of myeloproliferatieve kenmerken in de niet-mestcel cellijnen (één van de zogenaamde "B findings") en mogelijke aanwezigheid van een geassocieerde hematologische aandoening (SM-AHN) is beoordeling van de cytologie van het bloed en beenmergaspiraat essentieel.

Kwaliteitseisen en registratie

Voor correcte beoordeling van de aan- of afwezigheid van het minor criterium van meer dan 25% afwijkende mestcellen, de aan- of afwezigheid van dysplasie of myeloproliferatieve kenmerken in de niet-mestcel cellijnen (één van de zogenaamde "B findings") en de mogelijke aanwezigheid van een geassocieerde hematologische aandoening (SM-AHN) is de kwaliteit van het beenmergaspiraat zeer belangrijk. Naast onbeschadigde, goed beoordeelbare losliggende mestcellen dienen ook voldoende, goed beoordeelbare beenmergbrokjes in de preparaten aanwezig te zijn. Omdat het aantal losliggende mestcellen in een beenmergaspiraat vaak erg laag is (bij de meeste patiënten <1%), is soms beoordeling van meerdere preparaten nodig. Voor een betrouwbare interpretatie dienen minimaal 20 mestcellen beoordeeld te worden.

KIT (D816V) mutatie analyse

Aanwezigheid van de KIT D816V mutatie is één van de minor criteria voor systemische mastocytose. De KIT D816V mutatiebepaling kan worden uitgevoerd op bloed en op beenmerg, waarbij in bloed niet alleen de aan- of afwezigheid belangrijk is maar ook de allelic burden van belang is, aangezien deze correleert met klinische uitkomst (Hoermann et al., 2014).

Afname

4-10 ml Bloed (EDTA-onstold) en/of 2-3 ml beenmergaspiraats (EDTA-onstold).

Beoordeling/test

(Kwantitatieve) PCR test voor specifieke detectie van de KIT D816V mutatie.

Kwaliteitseisen

De KIT D816V assay moet voldoen aan de volgende voorwaarden:

1. Gevoeligheid van tenminste 0,01%. Omdat de tumorload in bloed en beenmerg laag kan zijn (in meeste patiënten <1%), is een gevoelige methode noodzakelijk. De minimale gevoeligheid die behaald dient te worden is 0,01%. Aangeraden wordt een allel-specifieke RQ-PCR te gebruiken (Arock et al., 2015; Kristensen et al., 2014; Erben et al., 2014; Kristensen et al., 2011). NGS-gebaseerde technieken lijken vooralsnog onvoldoende gevoelig (Kristensen et al., 2015). Er zijn commerciële, CE-IVD gecertificeerde RQ-PCR assays beschikbaar (Kristensen et al., 2020).
2. Voor vaststellen van allelic burden in bloed: een kwantitatieve test is vereist, en hiervoor wordt een RQ-PCR aangeraden. Ook een digital-droplet PCR kan worden gebruikt (Greiner et al., 2017). Het wordt aangeraden om de analyses uit te voeren op genomisch DNA en niet op mRNA (Kristensen et al., 2016).

Flowcytometrische analyse CD2 en/of CD25 expressie mestcellen

Aanwezigheid van CD25+ of CD2+/CD25+ mestcellen is één van de minor criteria voor systemische mastocytose. Deze expressie kan worden bepaald met immunohistochemische kleuringen op het beenmergbiopsaat (zie boven) of middels flowcytometrische analyse van een beenmergaspiraats.

Afname

2-3 ml beenmergaspiraats (heparine- of EDTA-onstold)

Beoordeling/test

Voor de flowcytometrische analyse van het beenmergaspiraats wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van een lyse-stain-wash methode. Hierbij worden in een eerste stap de erythroïde cellen gelyseerd en wordt er een kleuring ingezet op de verrijkte witte bloedcellen. Voordeel is dat er een hoog aantal witte bloedcellen gekleurd kan worden zodat er ook voldoende mestcellen kunnen worden gemeten. Voor de identificatie van de mestcellen is het gebruik van CD45 en CD117 aangeraden, daarnaast dient minimaal CD25 in het panel aanwezig te zijn en is CD2 optioneel.

Kwaliteitseisen

Aangezien het percentage mestcellen laag kan zijn, dienen minimaal 1.000.000 leukocyten te worden gemeten. Voor een betrouwbare interpretatie dienen minimaal 20 mestcellen aantoonbaar te zijn.

Serum Tryptase

Afname

Voor het aantonen van een chronisch aanhoudende verhoogde uitscheiding van tryptase door mestcellen (basale tryptaseconcentratie) is afname van 4-10 ml bloed in een stolbuis (serum) nodig. Voor het bevestigen van een allergische of anafylactische reactie is afname nodig van 4-10 ml bloed in een stolbuis (serum) binnen 5 minuten tot 3 uur na een gebeurtenis die mestcelactivatie kan veroorzaken.

Lipemische, hemolytische of microbiële gecontamineerde monsters kunnen vals verhoogde waarden geven. Bewaaromstandigheden serum: 2 weken bij 4 graden Celsius of enkele maanden bij -20 graden Celsius.

Test/beoordeling

De meest gebruikte analysemethode is een Fluoro Enzyme Immuno Assay (FEIA). Door complexvorming van tryptase met een enzym-gebonden anti-tryptase antilichaam ontstaat een antigeen-antilichaamcomplex en wordt een substraat omgezet waardoor een fluorescerend product ontstaat. De hoeveelheid fluorescerend product is een maat voor de hoeveelheid aanwezig tryptase. De referentiewaarden voor tryptase in het kader van anafylaxie is < 11,4 microgram/L. De basale tryptaseconcentratie is voor een persoon vaak constant. Een stijging van de tryptaseconcentratie kan ook relevant zijn wanneer de tryptaseconcentratie < 11,4 microgram/L blijft (Borer-Reinhold et al., 2011). De afkapwaarde voor het diagnostisch minor criterium voor systemische mastocytose is 20 microgram/L. Wanneer er een geassocieerde hematologische maligniteit (SM-AHN) aanwezig is, kan de tryptaseconcentratie extra verhoogd zijn en geldt de afkapwaarde van 20 microgram/L niet meer.

Kwaliteitseisen

Er dient rekening mee gehouden te worden dat serum tryptaseconcentraties ook verhoogd kunnen zijn bij nierinsufficiëntie, andere hematologische maligniteiten en aanwezigheid van heterofiele antistoffen.

MH/MIMA in urine

Synthese, opslag en excretie van histamine vinden voornamelijk plaats in mestcellen en basofiele granulocyten. Vrijgekomen histamine wordt in het bloed snel enzymatisch gedeactiveerd en als histaminemetabolieten methylhistamine (MH) en methylimidazolazijnzuur (MIMA) uitgescheiden in de urine.

Afname

Voor het aantonen van een chronisch aanhoudende verhoogde uitscheiding van histamine door mestcellen dient de excretie in de urine van de histaminemetabolieten methylhistamine (MH) en methylimidazolazijnzuur (MIMA) in een nuchtere tweede portie ochtendurine (na uitplassen van een eerste fractie urine) of in een portie uit een 24 uren verzamelde urine gebruikt te worden. De urine dient te worden opgevangen in een urinebokaal (bij voorkeur geen glazen bokaal/container vanwege absorptie van aminen aan de glaswand), waarin vooraf circa 0,5 ml chloorhexidine 20% oplossing is toegevoegd, omdat de concentratie van de histaminemetabolieten in de urine kan toenemen door bacteriële contaminatie.

Voor het bevestigen van een allergische of anafylactische reactie dient urine 1 tot 2 uur na het optreden van een aanval/reactie verzameld te worden, de excretie is dan maximaal. MIMA vertoont een tragere uitscheiding dan MH en kan tot vele uren na het optreden van een reactie nog verhoogd blijven. Tevens wordt sterk aanbevolen om ook een portie urine uit een aanvalsvrije periode, als referentie, te verzamelen.

Met een bacteriostaticum (chloorhexidine) afgenomen urine kan bij kamertemperatuur (maximaal 2 weken), 4 graden Celsius (3 maanden) of ingevroren (onbeperkt) bewaard worden en dient bij het Laboratorium Bijzondere Chemie van de afdeling Laboratoriumgeneeskunde van het UMCG afgeleverd te worden (zie NVKC website: <https://www.nvkc.nl/>).

Test/Beoordeling

De bepaling van histamine en metabolieten in urine (XLC-MS/MS) bestaat uit het toepassen van een combinatie van verschillende technieken: monstervoorbewerking (derivatiseren), monster-opzuivering m.b.v. solid phase extractie ((SPE), vloeistofchromatografische scheiding van interferenties (LC) en tandem massaspectrometrische detectie (MS/MS).

Er dient rekening mee gehouden te worden dat de urine excretie van histamine metabolieten extra verhoogd kan zijn bij aanwezigheid van een geassocieerde hematologische maligniteit (SM-AHN) of bij bepaalde andere hematologische maligniteiten, m.n. waarbij een toename van het aantal basofiele

granulocyten wordt gevonden, zoals bij Chronische Myeloïde Leukemie (CML) en Polycythemia Vera (PV).

De referentiewaarden voor volwassenen zijn voor MH < 150 micromol/mol Kreat en voor MIMA 0,9 – 1,9 millimol/mol Kreat. De excretie van histaminemetabolieten in de urine is leeftijdsafhankelijk en bij kinderen hoger dan bij volwassenen.

Kwaliteitseisen

Omdat door inname van histaminerijk voedsel, zoals zuurkool, kaas, yoghurt, spinazie, aubergines, vis uit blik en wijn, de excretie van histaminemetabolieten verhoogd wordt, dienen vanaf de dag voorafgaande aan de dag van afname van de urine deze voedingsmiddelen en dranken niet meer ingenomen te worden.

Referenties

Lee, S. H., Erber, W. N., Porwit, A., Tomonaga, M., Peterson, L. C., & International Council for Standardization In Hematology. (2008). ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *International journal of laboratory hematology*, 30(5), 349-364.

Hoermann G, Gleixner KV, Dinu GE, Kundi M, Greiner G, Wimazal F, Hadzijasufovic E, Mitterbauer G, Mannhalter C, Valent P, Sperr WR. The KIT D816V allele burden predicts survival in patients with mastocytosis and correlates with the WHO type of the disease. *Allergy*. 2014 Jun;69(6):810-3. doi: 10.1111/all.12409. Epub 2014 Apr 17. PMID: 24750133; PMCID: PMC4896381.

Arock M, Sotlar K, Akin C, Broesby-Olsen S, Hoermann G, Escribano L, Kristensen TK, Kluin-Nelemans HC, Hermine O, Dubreuil P, Sperr WR, Hartmann K, Gotlib J, Cross NC, Haferlach T, Garcia-Montero A, Orfao A, Schwaab J, Triggiani M, Horny HP, Metcalfe DD, Reiter A, Valent P. KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis. *Leukemia*. 2015 Jun;29(6):1223-32. doi: 10.1038/leu.2015.24. Epub 2015 Feb 4. PMID: 25650093; PMCID: PMC4522520.

Kristensen T, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Møller MB, Broesby-Olsen S; Mastocytosis Centre, Odense University Hospital (MastOUH). Sensitive KIT D816V mutation analysis of blood as a diagnostic test in mastocytosis. *Am J Hematol*. 2014 May;89(5):493-8. doi: 10.1002/ajh.23672. Epub 2014 Feb 21. PMID: 24443360.

Erben P, Schwaab J, Metzgeroth G, Horny HP, Jawhar M, Sotlar K, Fabarius A, Teichmann M, Schneider S, Ernst T, Müller MC, Giehl M, Marx A, Hartmann K, Hochhaus A, Hofmann WK, Cross NC, Reiter A. The KIT D816V expressed allele burden for diagnosis and disease monitoring of systemic mastocytosis. *Ann Hematol*. 2014 Jan;93(1):81-8. doi: 10.1007/s00277-013-1964-1. Epub 2013 Nov 27. PMID: 24281161.

Kristensen T, Vestergaard H, Møller MB. Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J Mol Diagn*. 2011 Mar;13(2):180-8. doi: 10.1016/j.jmoldx.2010.10.004. PMID: 21354053; PMCID: PMC3279709.

Kristensen T, Broesby-Olsen S, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Møller MB; Mastocytosis Centre Odense University Hospital (MastOUH). Targeted ultradeep next-generation sequencing as a method for KIT D816V mutation analysis in mastocytosis. *Eur J Haematol*. 2016 Apr;96(4):381-8. doi: 10.1111/ejh.12601. Epub 2015 Jun 26. PMID: 26095448.

Kristensen T, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Møller MB, Broesby-Olsen S; Mastocytosis Centre Odense University Hospital (MastOUH). Clinical validation of a new commercial highly sensitive KIT D816V mutation analysis in mastocytosis. *Allergy*. 2020 Jun;75(6):1489-1491. doi: 10.1111/all.14165. Epub 2020 Jan 31. PMID: 31883383.

Greiner G, Gurbisz M, Ratzinger F, Witzeneder N, Simonitsch-Klupp I, Mitterbauer-Hohendanner G, Mayerhofer M, Müllauer L, Sperr WR, Valent P, Hoermann G. Digital PCR: A Sensitive and Precise Method for *KIT* D816V Quantification in Mastocytosis. *Clin Chem*. 2018 Mar;64(3):547-555. doi: 10.1373/clinchem.2017.277897. Epub 2017 Dec 13. PMID: 29237714; PMCID: PMC7115889.

Kristensen T, Broesby-Olsen S, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Møller MB; Mastocytosis Centre Odense University Hospital (MastOUH). Comparison of gDNA-based versus mRNA-based *KIT* D816V mutation analysis reveals large differences between blood and bone marrow in systemic mastocytosis. *Br J Haematol*. 2017 Jul;178(2):330-332. doi: 10.1111/bjh.14123. Epub 2016 May 16. PMID: 27196380.

Borer-Reinhold, M., Haeberli, G., Bitzenhofer, M., Jandus, P., Hausmann, O., Fricker, M., ... & Müller, U. (2011). An increase in serum tryptase even below 11.4 ng/mL may indicate a mast cell-mediated hypersensitivity reaction: a prospective study in Hymenoptera venom allergic patients. *Clinical & Experimental Allergy*, 41(12), 1777-1783.