

Immunphänotypisierung von Non-Hodgkin-Lymphomen

Einteilung

Neoplastische Erkrankungen reifer Lymphozyten, die auch als maligne Lymphome bezeichnet werden, sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihres Verlaufes (hoch-maligne vs. niedrig-maligne), bezüglich ihrer Abstammung von B-, T- oder NK-Lymphozyten, einer möglichen Ausschwemmung in das periphere Blut, ihrer Morphologie, der Expression bestimmter Antigene auf der Lymphozytenoberfläche sowie genetischer Veränderungen. Diese Charakteristika sind die Grundlage der Einteilung der Lymphome nach der WHO-Klassifikation von Tumoren des hämatopoietischen Systems. Diese grenzt die Hodgkin-Lymphome von Non-Hodgkin-Lymphomen ab und unterteilt die letzteren in mehr als 70 unterschiedliche Tumorentitäten. Aus dem bisher Dargestellten lässt sich bereits erahnen, dass zur Diagnosestellung eine interdisziplinäre Zusammenarbeit unter Einsatz verschiedenster Verfahren notwendig ist [1].

Sonderfall CLL

Aus verschiedenen Gründen ist im medizinischen Alltag die chronisch-lymphatische Leukämie (CLL) von besonderer Bedeutung. Es handelt sich um die häufigste lymphatische Neoplasie mit einer Inzidenzrate von 4,9 (Männer) bzw. 2,5 (Frauen) auf 100.000 Einwohner. Anzumerken ist, dass die Neuerkrankungsrate mit zunehmendem Alter deutlich ansteigt. Die Erkrankung verläuft häufig indolent, so dass ihre Diagnose oft nur zufällig gestellt wird. Auch eine Behandlung ist nur beim Auftreten von Symptomen angezeigt. Da keine genetischen Marker bekannt sind, die spezifisch für die CLL sind, basieren die diagnostischen Kriterien auf der Immunphänotypisierung (FACS-Analyse) und der Morphologie. Als minimale Kriterien werden der Nachweis von >5000 klonalen B-Zellen pro µl Blut gefordert, die neben den B-Zell-Antigenen CD19 und CD20 auch noch CD5 und CD23 exprimieren [2]. Entscheidend ist eine sichere Abgrenzung zu anderen B-Zell-Lymphomen, da diese sich in der notwendigen Therapie und der Prognose von der der CLL

Diagnostische Kriterien der CLL nach IWCLL/WHO-Klassifikation [1, 2]

- Nachweis von mehr als 5000 klonalen B-Lymphozyten pro µl im peripheren Blut
- Mikroskopisch handelt es sich bei den Zellen um kleine, reife Lymphozyten mit schmalem Zytoplasma um, in der Regel ohne Nukleoli und mit einem partiell kondensierten Chromatin
- Der Anteil anderer atypischer Lymphozyten (insbesondere Prolymphozyten) darf 55 % der Gesamtlmphozyten nicht überschreiten
- Immunphänotypisch exprimieren die Zellen CD5 und CD23, charakteristisch ist eine schwache Expression von CD20, Oberflächen-Immunglobulinen und CD79b

grundlegend unterscheiden. In einem aktuellen internationalen Konsenspapier wird daher empfohlen, neben den für die Diagnose der CLL zwingend notwendigen Markern auch noch weitere zu untersuchen [3].

Notwendige und empfohlene Marker zur Diagnostik der CLL nach ESCCA/ERIC-Konsensus [3]

Notwendig: CD19, CD20, CD5, CD23, Kappa, Lambda

Zusätzlich empfohlen: CD43, CD79b, CD81, CD200, CD10, ROR1



Ärztlicher Befundbericht

Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung (Lymphomdiagnostik) EDTA-Blut

		Normwerte		Normwerte
Leukozyten	12000 /µl	3900 - 10200		
Lymphozyten	9360 /µl	1100 - 4500	78 %	20 - 44
Monozyten	1200 /µl	100 - 900	10 %	2 - 9,5
Granulozyten	1440 /µl	1500 - 7700	12 %	42 - 77
Lymphozyten-subpopulationen				
B-Zellen	8826 /µl	120 - 630	94,3 %	7 - 21
T-Zellen	477 /µl	61 - 84	5,1 %	61 - 84
NK-Zellen	47 /µl		0,5 %	
T-Zellen				
CD4+ T-Zellen	328 /µl	32 - 60	4 %	32 - 60
CD8+ T-Zellen	122 /µl	23 - 40	8 %	23 - 40
Ratio CD4/CD8	2,69	1 - 3		
B-Zellen				
CD19+/kappa+	0,3 %	52 - 63		
CD19+/lambda+	99,5 %	35 - 47		
Kappa/Lambda-Ratio	0	1,1 - 1,8		

Es wurde die Expression folgender Antigene untersucht: CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD14, CD19, CD20, CD23, CD38, CD45, CD56, CD57, kappa- und lambda-Leichtketten und gamma/delta-T-Zell-Rezeptor.

Absolute Lymphozytose. Bei der durchflusszytometrischen Analyse Nachweis einer klonalen B-Zell-Population mit folgendem Immunphänotyp: CD19+ CD20+(het) CD5+ CD10- CD23+ CD38- Lambda(+). Diese Population macht ca. 73 % der untersuchten Leukozyten aus (absolut ca. 8.800 Zellen/µl). Unauffällige CD4/CD8-Ratio der T-Zellen, keine veränderte Expression der Pan-T-Zell-Antigene CD3 und CD5. Unauffälliger Immunphänotyp der NK-Zellen.

Nach den Kriterien der WHO-Klassifikation liegt eine CLL mit typischem Immunphänotyp vor.

Monoklonale B-Lymphozytose

Ein Nachweis von weniger als 5000 klonalen B-Zellen pro µl Blut mit einem CLL-ähnlichen Phänotyp wird als monoklonale B-Lymphozytose (MBL) bezeichnet. Dies ist ein relativ häufiger Befund, der in bis zu 12 % bei gesunden Personen mit einem Alter >40 Jahre gefunden werden kann. In den letzten Jahren ist klar geworden, dass die MBL in der Regel als Vorläufer einer CLL anzusehen ist. Das Progressionsrisiko unterscheidet sich jedoch in Abhängigkeit von der

Haben Sie Fragen? Unser Service Team beantwortet sie gerne unter +49 (0)30 770 01-220.

Anzahl der klonalen B-Zellen: eine low-count-MBL (<500 klonale B-Zellen/ μ l) braucht in der Regel keine spezialisierte Verlaufskontrolle, während eine high-count-MBL (>500 klonale B-Zellen/ μ l) jährlich hinsichtlich ihrer Progression kontrolliert werden sollte.

Andere Formen leukämisch verlaufender Lymphome

Neben der CLL treten auch bei anderen lymphatischen Neoplasien leukämische Verläufe auf. Regelmäßig ist dies bei der Haarzelleukämie, fakultativ beim Mantelzell-, beim Marginalzonen-, beim lymphoplasmazytischen oder folliculären Lymphom der Fall. Neben diesen B-Zell-Lymphomen können auch T-Zell-Lymphome einen leukämischen Verlauf zeigen. Anzuführen wären hier unter anderem das Sézary-Syndrom und die LGL- (large granular lymphocyte) Leukämie. Auch hier kann durch eine durchflusszytometrische Lymphomtypisierung häufig eine Diagnose gestellt werden, insbesondere weil in den letzten Jahren neue Marker in die Diagnostik eingeführt wurden.

Durchflusszytometrische Lymphomtypisierung als Stufendiagnostik

Die durchflusszytometrische Lymphomtypisierung ist neben der klassischen hämatologischen Diagnostik mit Blutbild und manueller Differenzierung ein wesentlicher Baustein bei der Abklärung einer Lymphozytose. Indikationen zur Durchführung dieser Untersuchung sind:

- vermehrtes Auftreten von atypischen Lymphozyten ohne Anhalt für (viralen) Infekt
- Abklärung auch mäßiggradiger Lymphozytosen und Lymphopenien, auch bei asymptomatischen Patienten
- Splenomegalie/Lymphknotenschwellungen
- klinischer Verdacht auf ein NHL: Vorliegen einer B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust), Anämie, Blutungsneigung
- Differentialdiagnostik bei einer monoklonalen Gammopathie, insbesondere vom Typ IgM
- anders nicht erklärbare Eosinophilie
- Verlaufskontrolle bei monoklonaler B-Lymphozytose (MBL)

Wegen der Vielzahl in Frage kommender Krankheitsentitäten und Marker und steigendem Kostendruck sollte die Diagnostik als Stufendiagnostik durchgeführt werden. Dies erlaubt zunächst einen Ausschluss oder Nachweis einer klonalen Lymphozytenpopulation. Basierend auf diesem Ergebnis werden dann zusätzlich ganz bestimmte Marker auf der Zelloberfläche bestimmt, die die benötigte diagnostische Information liefern. Am IMD Berlin wurde dies so umgesetzt, dass in der ersten Stufe der Diagnostik eine Abgrenzung von reaktiven und malignen Lymphozytosen vorgenommen werden kann. Gleichzeitig kann damit schon die Diagnose einer CLL mit klassischem Immunphänotyp gestellt werden. Basierend auf unseren Erfahrungen gelingt damit bei unserem Patientenkollektiv schon bei 75 % der Patienten die Diagnosestellung. In der zweiten Stufe der Diagnostik werden die im internationalen Konsens empfohlenen zusätzlichen Marker untersucht. Dies dient der sicheren Abgrenzung

einer CLL gegenüber anderen Entitäten von B-NHL in Fällen, in denen der Immunphänotyp in der ersten Stufe oder die Morphologie nicht typisch für eine CLL sind. In einer dritten Stufe der Diagnostik können dann gegebenenfalls noch weitere Marker zur Differentialdiagnostik verschiedener B-NHL-Entitäten untersucht werden. Somit ist eine gezielte und damit sehr kosteneffiziente Diagnostik möglich.


Material

2 ml EDTA-Blut

Die Laboranforderung auf dem Überweisungsschein lautet: Lymphomtypisierung

Abrechnung

Eine Abrechnung ist bei gegebener Indikation im kassen- und privatärztlichen Bereich gegeben.



Ärztlicher Befundbericht

Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung (Lymphomdiagnostik) EDTA-Blut

		Normwerte		Normwerte
Leukozyten	13000 / μ l	3900 - 10200		
Lymphozyten	6500 / μ l	1100 - 4500	50 %	20 - 44
Monozyten	390 / μ l	100 - 900	3 %	2 - 9,5
Granulozyten	6110 / μ l	1500 - 7700	47 %	42 - 77
Lymphozyten-subpopulationen				
B-Zellen	4303 / μ l	120 - 630	66,2 %	7 - 21
T-Zellen	2080 / μ l	920 - 2580	32 %	61 - 84
NK-Zellen	84 / μ l	210 - 740	1,3 %	10 - 30
T-Zellen				
CD4+ T-Zellen	1430 / μ l	550 - 1460	22 %	32 - 60
CD8+ T-Zellen	500 / μ l	280 - 930	8 %	23 - 40
Ratio CD4/CD8	2,86	1 - 3		
B-Zellen				
CD19+/kappa+	45,6 %	52 - 63		
CD19+/lambda+	2,2 %	35 - 47		
Kappa/Lambda-Ratio	20,73	1,1 - 1,8		

Es wurde die Expression folgender Antigene untersucht: CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD11c, CD14, CD19, CD20, CD22, CD23, CD27, CD38, CD43, CD45, CD56, CD57, CD79b, CD81, CD95, CD103, CD185, CD200, CD305, kappa- und lambda-Leichtketten, IgM, ROR1, HLA-DR und gamma/delta-T-Zell-Rezeptor.

Absolute Lymphozytose. Bei der durchflusszytometrischen Analyse Nachweis einer klonalen B-Zell-Population mit folgendem Immunphänotyp: CD19+ CD20+ CD5+ CD10- CD103- Kappa+. Diese Population macht ca. 23 % der untersuchten Leukozyten aus (absolut ca. 2100 Zellen/ μ l). Daneben Nachweis einer Zellpopulation mit Expression Blymphozytärer Marker, aber ohne Expression von Immunglobulinleichtketten auf der Zelloberfläche. Unauffällige CD4/CD8-Ratio der T-Zellen, keine veränderte Expression der Pan-T-Zell-Antigene CD3 und CD5. Unauffälliger Immunphänotyp der NK-Zellen.

In Zusammenschau mit der Morphologie und den Befunden der Serumproteinanalytik (dort Nachweis einer monoklonalen Gammopathie IgM-Kappa) spricht der Befund für das Vorliegen eines Lymphoplasmazytischen Lymphoms (Morbus Waldenström). Gegebenenfalls könnte mit der Untersuchung einer MYD88 L265P- oder CXCR4-Mutation eine noch bessere differentialdiagnostische Abgrenzung zum IgM-MGUS oder IgM-Myelom erreicht werden.

Literatur

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD et al: The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016, 127(20):2375-2390.
2. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR et al: Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia up

3. Rawstron AC, Kreuzer KA, Soosapilla A, Spacek M, Stehlikova O, Gambell P, McIver-Brown N, Villamor N, Psarra K, Arroz M et al: Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry Part B, Clinical cytometry* 2018, 94(1):121-128.