



AUS DEM INTERNET

ZWEI NHL

Ein italienischer Kollege berichtet von 2 unklaren Fällen von NHL, die beide (von anderer Stelle) als CLL (er nennt es LCC) klassifiziert wurden, was er anzweifelt.



Silvana (S.Bonfigli@ipsoe.ss.cnr.it)

I would like to submit two cases :

case 1: 60-year-old male with splenomegaly without lymphadenopathy, mild lymphocytosis (WBC 9000, Ly 5000), Hb 10 gr/dl, PLTS 130.000 mm³. Coombs positive with normal haptoglobin and bilirubine. Bone marrow with focal lymphocytosis (40%). Immunophenotype: CD19: 60%, CD5 neg, CD23 neg, CD25 neg, CD22 50%, CD11c 10%, k 50%, lambda 2%.

case 2: 65-year-old female with splenomegaly without lymphadenomegaly. Cryoglobulinemia, HCV positive, lymphocytosis (ly 20.000). Bone marrow infiltration (70%) by lymphocytes of little size.

Immunophenotype: CD19 67%, CD22 69%, CD23 neg, CD11c 20% (dim), CD25 neg, lambda monoclonality. both cases have been previously characterized by others as LLC, but I think that the immunophenotypes are not consistent with either LLC or HCL. Is that true or do anybody know variant forms of LLC or HCL with these phenotypes?

Thank you in advance
Silvana

I would like to add some precisations to those who kindly answer me.

CD5 was negative in both patients. FMC7 and CD103 were not performed.

Thank you for your suggestions
Silvana

Daniel Arber (darber@smtplink.Coh.ORG)

Was FMC7 done and was CD5 negative on Case 2? The findings should be correlated with the peripheral blood morphology, but both cases could be splenic marginal zone lymphomas (SLVL) or even non-splenic marginal zone lymphoma. What does LLC stand for?

Anna Porwit-MacDonald (Anja.Porwit@mb.ks.se)

Hi,

in both cases the immunophenotype can be consistent with marginal zone lymphoma (splenic? with or without villous lymphocytes?) For differentiation with HCL you could use CD103 (Bly7) and tartrate resistant acid phosphatase.

Best wishes

Anna

Nebe, Thomas (thomas.nebe@ikc.ma.uni-heidelberg.de)

Dear colleague,

the description you gave is difficult to interpretate.

1) Does your CD23 work in healthy donors? (Most B cells are positive)

2) Your panel should always include CD5 (CLL, FL), CD10 (Burkitt), CD38 (IC) and CD103 for HCL.

We currently discuss a NHL panel among some experienced people and others who want to participate are wellcome.

3) Should LLC read CLL?

4) Positivity of markers could depend on the fluorochrome and marker setting (eg. CD25-PE gives a positive result in CLL).

5) CD22 and light chains are dim and FMC7 is negative on CLL B cells. Morphology also

„Positivity of markers could depend on the fluorochrome...“

helps a lot.

6) Could you submit pictures from the cells from the slide (in JPEG format, eg. from a video camera on a microscope)?

7) Reactive lymphocytosis is sometimes also pretty monoclonal.

8) If CD19 is dim consider cytoplasmic staining of light chains for immunocytoma.

There are more suggestions or questions as the picture is incomplete.

Kind regards

Thomas Nebe

Es hat eigentlich wenig Sinn über den Phänotyp der zwei Fälle zu rätseln, da die Informationen inkomplett sind. Es mag ja sein, daß man bei NHL manchmal zu viele Marker macht, aber ohne CD10 auszukommen wird schwierig. Auch schreibt Silvana nicht, wie stark die Expression z.B. von CD22 oder den Leichtketten ist. Eine Prozentangabe ist da sicher zu wenig.

Niemand kann mit den vorliegenden Daten eine seriöse Antwort geben. Die 2 Kollegen, die ein Marginalzonenlymphom für möglich betrachten haben zwar prinzipiell nicht unrecht, aber der angegebene Phänotyp würde auf alles mögliche passen (man darf nicht immer einen ganz typischen Phänotyp erwarten).

Die fundierteste Antwort ist meines Erachtens die von Thomas Nebe, der diese Probleme anspricht und mit sehr gutem Grund auch die Morphologie ins Spiel bringt. Man darf eine Diagnose nicht zu sehr auf einem Immunphänotyp aufbauen, was aus den zahllosen +/- in den Immunphänotyptabellen eigentlich sehr deutlich wird. Bei CD5 hat Nebe irrtümlich das Follikuläre Lymphom genannt, da hat er sicher das Mantelzelllymphom gemeint, das FL sollte bei CD10 erwähnt werden, denn ein CD5positives FL ist ungewöhnlich.

Das ist ein Problem bei diesem Email Server: die Beiträge sind nicht rezensiert. Da kommt es natürlich manchmal zu kleinen Druckfehlern wie diesem, manchmal aber leider auch zu größerem Schwachsinn. Das wird in FM sicher ebenso passieren.

AMERIKANISCHER FACS-FLOW TOXISCH?

Es gibt eine rezente Diskussion um die Toxizität von FACSFlow. Manche Flower haben bemerkt, daß nach dem Sortieren ihre Zellen tot sind. Eine Diskutantin behauptet, daß nur das nordamerikanische nicht aber das belgische FACSFlow (das nach Europa und Kanada geliefert wird) toxisch ist.

From: Bill Thronset

I recently had to switch from Criterion Diluent 2, Azide Free to FACSflow. Lo and behold, all of my cells died. I spoke to a BDIS representative and she told me that FACSflow "can be a problem for live cell sorting." Needless to say, I was extremely unhappy that there was no indication of this in the product description in the BD catalog, or on the boxes of diluent themselves. Since then, I have used PBS, Coulter Isoflow, and now I'm back to Criterion, with no viability problems.

From: Newsom, Brian S. (bsnewsom@msmail.his.tch.tmc.edu)

We found the same thing. BD does not advertise that their sheath is toxic, but indeed it is. If you ask them they usually quote the line you gave. We tested the sheath on cells without sorting and it killed them within 15 minutes of incubation. We make our own sheath now and we have no problems.

From: Claude Cantin (cantinc@oci.utoronto.ca)

Apparently, American FACSFlow is toxic. That marketed by BD in Canada (and parts of Europe) is imported from Belgium, and cells sorted with this solution are quite viable, as many of us north of the 49th parallel have experienced. This "duality" ... same name, same continent, different product... may add to the confusion over toxic vs non-toxic FACSFlow. Why BD hasn't made this clear across the board is a mystery to me, as is why this (non-toxic) formulation is not marketed in the USA (FDA?). There is a demand for it...

WIEVIEL CD7-/CD4+ SIND NOCH NORMAL?



*From: robert gniadecki
(rgniadecki@hotmail.com)*

I am interested in expression of CD7 marker on peripheral CD4 cells in different skin diseases. I was surprised to see that approx. 40% of CD4+ cells were CD7- in normal persons (Anmerkung: im peripheren Blut), which is in contrast with some published data where the CD4+CD7- population was less than 10%. Has anybody an experience in clinical application of the CD7 marker and any idea of normal values??? Any suggestions are welcome.

"I was surprised to see that approx. 40% of CD4+ cells were CD7- in normal persons"

Eine interessante Frage. Auch so eine typische Literatur/Realitätsdiskrepanz. Die Frage nach Normalwerten wäre interessant, noch wichtiger aber wäre wahrscheinlich, wie hoch der Anteil bei nicht-T-Zellymphomen und bei benignen Erkrankungen werden kann. Wenn jemand systematische Daten hat soll er uns diese bitte übermitteln. Meine (anekdotische) Erfahrung mit CD7-/CD4+ Zellen ist: einerseits sind manchmal die CD7 positiven so schwach positiv, daß sie teilweise unter die (nach der Isotypkontrolle gesetzte) Positivschwelle fallen. Das ist nicht weiter tragisch, denn daß diese Zellen trotzdem als CD7 positiv bezeichnet werden dürfen, hat sich schon herumgesprochen. Beunruhigender ist es, wenn eine größere von den CD7+/CD4+ Zellen deutlich abgegrenzte CD7-/CD4+ Population auftritt. Wir haben diese zwar bei nicht-T-Zellymphomen noch nie bei 40% gesehen, aber öfter um die 20%. Eine Konsequenz daraus ist, daß der Phänotyp CD4+/CD7- vielleicht typisch für Sezaryzellen ist, sich aber als Marker für den Nachweis einer geringen Ausschwemmung überhaupt nicht eignet.

Warum gibt es eigentlich so wenig brauchbare Daten hierzu? Ich glaube eine Ursache liegt darin, daß die großen Lymphomzentren, die

die Publikationen dominieren, das von einer anderen Seite sehen. Da wird mittels Klinik, Pathologie, PCR und/oder Southern Blot die Diagnose gestellt und dann beobachtet man halt noch daß die Sezarysyndrome oft CD7negativ sind. Wir sehen das aber von der anderen Seite: uns wird Blut zur Typisierung geschickt mit der Fragestellung, ob Zellen eines kutanen T-Zellymphoms nachweisbar sind oder nicht [Wie sinnvoll das auch immer sein mag]. Oder wir beobachten zufällig eine hohe

Anzahl von CD4+/CD7- bei einem Patienten ohne klinischen Verdacht auf ein T-Zellymphom. Da ist die Angabe in der Literatur, bei wieviel % aller T-Zellymphome CD7 verloren geht, ziemlich wertlos. Da wäre es wichtig zu wissen,

bei welchen nicht malignen Erkrankungen solche Zellen in welcher Anzahl und Verteilung auftreten können. Ähnliche Probleme gibt es ja bei den CD4/CD8 doppelt positiven. Wenn zu diesen Fragestellungen niemand Daten hat, allgemeines Interesse und Bereitschaft besteht, könnten wir ja auch eine koordinierte Messung in verschiedenen Labors durchführen um systematische Daten zu bekommen. Vielleicht genügt es auch, nach einer gewissen Standardisierung und Definition der Methodik, die in der Routine gesammelte Daten zusammenzufassen. Wie zu allen anderen Themen, sind auch hierzu Vorschläge und Anregungen sehr willkommen.

COLD BLOCK NOTWENDIG

Eine Sache, die erfahrene Zweistufenmarkierer langweilen wird, aber vielleicht für jene, die damit anfangen wollen, von Interesse ist.



*From Roxana Schillaci
(rschilla@proteus.dna.uba.ar)
[Argentinien]*

*Hi everybody:
I have a problem with indirect immunofluoresce labeling plus direct one. When I labed*

Jurkat cells with an indirect immunofluorescence (first Ab is a mouse m Ab (IgG1) and 2nd Ab is goat anti-mouse IgG-FITC) and then with CD25 R-PE there is a non specific binding of the last Ab (I have 75% positive!!) (of course I wash in each step...). When I label the cells only with CD25 I have 3-5% positive cells, which is OK with the literature. What is going on? How can I ride of the non specific binding? Someone have simmilar problems? Thank you for helping me.

Wenn ich das interpretieren darf: Roxana markiert Zellen zuerst mit einem monoklonalen Maus AK (sie sagt nicht, mit welchem), dann mit einem Ziege-Antimaus IgG FITC, danach mit einem direkt markiertem CD25-PE und findet 75% CD25-positive Zellen, was ihr [zurecht] hoch vorkommt. Wenn sie nur mit CD25-PE markiert hat sie nur 3-5% positive Zellen. Sie fragt, warum das so ist.

From smonard@adarc.org

Hi Roxana



There is a simple solution to your problem. Incubate with 10% mouse serum before adding your directly conjugated antibody. If you think about it after adding your goat anti mouse antibody some of the mouse recognizing arms of that antibody will be unoccupied. These will readily bind your CD25 as it is also a mouse immunoglobulin hence massive non specific binding. You could use a CD25 antibody made in another species not too similar to a mouse (ie not rat unless your goat anti-mouse is absorbed against rat)

Your best bet is too get some mouse serum, inactivate at 56 degrees for 30 minutes aliquot and freeze. When you do your staining do your first two steps as usual, wash, aspirate supernatent then add about 20ul 10% mouse serum in PBS, leave at room temp for about 15 minutes then without washing add your CD25 antibody.

Good luck

S. Monard erklärt, daß der Sekundärantikörper nach Bindung an den primären Antikörper noch immer einige freie Bindungsstellen hat,

die dann den CD25-PE „unspezifisch“ binden, da der ja auch von der Maus ist.

Lösung: entweder einen CD25 einer anderen Spezies nehmen, oder, was vielleicht das Beste ist, die freien Bindungsstellen des Sekundärantikörpers durch Zugabe von Maus-Serum absättigen, bevor man den CD25er dazugibt. **W**