

MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN DER DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN UNTERSUCHUNG HÄMATOLOGISCHER NEOPLASMIEN.

Wolfgang Hübl, Ruth Jilch, Peter Michael Bayer

Zusammenfassung

Die Durchflusszytometrie hat sich zu einem wertvollen Werkzeug der Diagnose und Charakterisierung hämatologischer Neoplasien entwickelt. Sie ist eine wichtige Ergänzung zu morphologischen, zytogenetischen und molekularbiologischen Methoden. Sie erlaubt, auf effiziente Weise, eine gleichzeitige Bestimmung von Größe, Granularität, Antigenexpression, DNA-Gehalt und Proliferationsrate von Zellen. Die Diagnose von malignen lymphatischen Erkrankungen und die Linientypisierung akuter Leukämien gehören zu den wichtigsten Einsatzgebieten der Methodik. Darüber hinaus können aus dem Immunphänotyp Hinweise auf die Prognose der Erkrankung gewonnen werden, sowie ihr Verlauf beobachtet werden. Neben der Untersuchung des Blutes und Knochenmarks, eignet sich die Durchflusszytometrie auch hervorragend zur Charakterisierung von Zellen aus Biopsiematerial, eine Möglichkeit, die noch in viel zu geringem Ausmaß wahrgenommen wird, obwohl die Methode bei bestimmten Erkrankungen der Zytologie oder Histologie überlegen ist. Die nachfolgende Übersicht soll durch Darstellen der Möglichkeiten und Grenzen der Durchflusszytometrie die sinnvolle Anwendung und rationale Befundinterpretation der Methode aufzeigen.

Einleitung

Eine Übersicht über den Einsatz der Durchflusszytometrie in der Hämatologie kann nicht ganz ohne methodische Angaben auskommen. Wir haben aber versucht, den klinischen Standpunkt nicht aus den Augen zu verlieren und technisch-methodische Einzelheiten nur dann angeführt, wenn diese das Prinzip verdeutlichen. Ziel war, dem mit der Durchflusszytometrie nicht im Detail Vertrauten einen Überblick zu geben, wann der Einsatz der Technik sinnvoll sein kann und was von einem Befund zu erwarten ist. Dabei gingen wir von den Möglichkeiten eines normalen durchflusszytometrischen Labors aus. Methoden, die nur in wenigen Labors durchführbar oder keinen Eingang in die Routine gefunden haben, wurden nicht berücksichtigt. Die Auswahl der diskutierten Indikationen beruht auf Erfahrungswerten, die im Rahmen der Zusammenarbeit mit klinischen Abteilungen gewonnen wurden.

1. AKUTE LEUKÄMIE

1.1 Diagnostik

Die meisten Einsendungen bei akuter Leukämie erfolgen zur Linientypisierung bei bereits feststehender Diagnose. In manchen Fällen aber, meist bei nicht völlig eindeutigem morphologischen Befund, werden Proben zur Absicherung der Diagnose eingesandt. Tatsächlich kann die Durchflusszytometrie bei der Diagnostik einer akuten Leukämie hilfreich sein, es sind aber einige Einschränkungen zu beachten. Mit Hilfe der Immunphänotypisierung können auch morphologisch nicht eindeutige Zellen mit nur wenigen Markern als unreife Zellen erkannt werden. Dazu genügt oft die Untersuchung der Marker CD45, CD34, HLA-DR und die Beurteilung des Seitwärtsstreichlichtes^{1, 2} (Abbildung 1). Liefert die durchflusszytometrische Untersuchung ein Ergebnis von mehr als 20 % unreifer Zellen im Knochenmark, unterstützt sie dadurch die Diagnose der

akuten Leukämie. Vorsichtig muss aber ein negativer durchflusszytometrischer Befund beurteilt werden. Dabei ergibt sich einerseits ein quantitatives Problem: die Blutverdünnung insbesondere bei schlechten Knochenmarksproben und niedrigem Blastenanteil im Blut kann den Anteil der unreifen Zellen in der Knochenmarksprobe deutlich

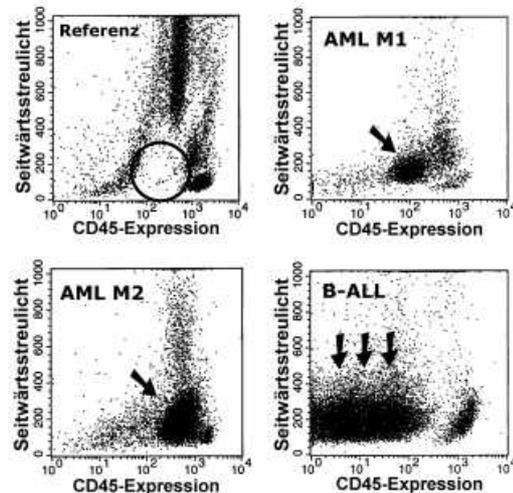


Abb. 1. Blastendetektion in der CD45-Seitwärtsstreichlicht-Darstellung

Der auch als Blastenfenster bezeichnete Bereich (Kreis im Diagramm Referenz) liegt zwischen Debris (links), Granulozyten (oben) und Mono- bzw. Lymphozyten (rechts). Bei der unreiferen AML-M1 zeigen die Blasten geringere CD45-Expression und Seitwärtsstreichlicht als bei der AML-M2. B-ALL Blasten können eine sehr geringe CD45-Expression aufweisen.

vermindern, also falsch niedrig werden lassen. Andererseits besteht auch ein qualitatives Problem: bei manchen Fällen von akuter Leukämie findet man keine durchflusszytometrisch als unreif imponierenden Zellen. So sind Zellen der AML-M5 manchmal stark CD45 positiv und können in der CD45-SSC Darstellung in die Region der normalen Monozyten fallen und nicht als unreif erkannt werden³. Auch bei der AML-M3, manchen AML-M2- oder reiferen ALL-Formen liegen die Leukämiezellen nicht immer in der typischen Blastenregion³. Die auf die Suche unreifer Zellen eingeschränkte Typisierung kann somit falsch negative Resultate bei der Fragestellung AML liefern. Falsch positive Resultate in der CD45-SSC Darstellung könnten theoretisch durch Plasmazellen, rote Vorstufen, Basophile Granulozyten, Thrombozytenaggregate und Debris entstehen. Sowohl falsch negative als auch falsch positive Resultate werden aber durch entsprechende Erfahrung und ein größeres Markerpanel vermieden.

1.2 Linientypisierung

Die größte Bedeutung der Durchflusszytometrie bei akuten Leukämien liegt in der Bestimmung der Zelllinie (myeloisch, B- oder T-lymphatisch). Dabei werden zwei verschiedene Philosophien verfolgt: die Methode der Stufendiagnostik⁴, bei der zuerst ein relativ kleines Antikörperpanel zur Linienfeststellung und danach ein spezifisches kleineres Panel zur Subgruppendefinition eingesetzt wird, und die Einstufendiagnose, bei der primär ein breites Panel Verwendung findet. Beide Methoden haben Vor- und Nachteile. Ein Beispiel für die Stufendiagnostik findet sich in Tabelle 1.

Tab. 1. Stufendiagnostik der akuten Leukämie. 1.Stufe.

| Typisch für: | Antigene |
|------------------------------|----------------------------------|
| B-lymphatische Zellen | CD19, zytCD22, zytCD79a, CD10 |
| T-lymphatische Zellen | zytCD3, CD7, CD2 |
| Myeloische Zellen | CD13, CD33, CDw65, CD117, zytMPO |
| unreife Zellen | CD34, TdT, HLA-DR |

Von der European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL) empfohlene 1. Stufe bei der Immunphänotypisierung akuter Leukämien⁴. Zur Definition der B-Linie sollten von den Markern CD19, zytCD22 und zytCD79a mindestens 2 nachweisbar sein. Zur Definition der T-ALL: CD3 zytoplasmatisch oder an der Oberfläche definiert die T-ALL. Expression von CD2 und CD7 reicht nicht aus. CD1a positive T-ALL gilt als common T-ALL unabhängig von der Reaktion von membran-CD3. In unklaren Fällen kann der EGIL-Score für biphänotypische Leukämien zur Anwendung kommen (Tabelle 4). Die zweite Stufe dient der weiteren Differenzierung der verschiedenen Leukämieformen.

1.3 Subgruppen der AML

Die durchflusszytometrische Untersuchung kann die FAB-Klassifikation nicht exakt reproduzieren, die auf morphologisch-zytochemischen, eher willkürlichen Kriterien beruht. Die Durchflusszytometrie kann aber in bestimmten Fällen, in denen die morphologische Untersuchung kein eindeutiges Ergebnis liefert, wichtige Hilfestellung zur Einteilung der AML bieten. So kann der Nachweis einer myeloischen Differenzierung auch bei Fällen mit morphologisch-zytochemisch negativen Befunden gelingen und damit das Vorliegen einer M0 nachgewiesen werden. Auch bestimmte Formen der AML-M2 zeigen typische Markerkonstellationen (AML mit t(8;21): CD34 auffallend stark exprimiert, CD19 positiv, CD56 positiv und CD15 positiv⁵. CD4- und CD14-Expression fehlen meist⁶).

Auch die Diagnose der Promyelozytenleukämie (AML-M3) kann der Immunphänotyp absichern helfen. Für die Unterscheidung der hypergranulären Form von normalen Promyelozyten könnte das Fehlen der CD15 Expression bei den meisten AML-M3 Fällen oder die (seltener) CD2-Expression herangezogen werden. Kann bei Vorliegen von Blasten eine hypogranuläre AML-M3 morphologisch nicht eindeutig ausgeschlossen werden, spricht das Vorhandensein von CD34 und/oder HLA-DR gegen eine AML-M3, schließt sie aber nicht aus^{3; 7-11}. Eine M3 kann also durchflusszytometrisch nicht eindeutig nachgewiesen wohl aber als wahrscheinlich oder unwahrscheinlich qualifiziert werden.

Für die Definition der AML-M4 und AML-M5 ist die monozytäre Komponente von Bedeutung. Während die Bestimmung von Monozyten mittels monoklonaler Antikörper prinzipiell sehr einfach ist, müssen bei der Verwendung durchflusszytometrischer Ergebnisse zur Abgrenzung einer AML-M4 oder AML-M5 mehrere Probleme berücksichtigt werden³. (a) Verschiedene normalerweise typische, monozytäre Antigene können auf monozytären Blasten fehlen (besonders CD14) andere, sensitivere Marker sind wenig spezifisch (HLA-DR, CD4, CD36). (b) Die als monozytäre Marker angesehenen CD14 und CD64 dürfen nur bei starker Ausprägung als eindeutiger Hinweis auf monozytäre Differenzierung gewertet werden. Diese beiden Probleme können bei geeigneter Antikörperwahl und ausreichender Erfahrung bewältigt werden. Nicht lösbar ist aber das dritte Problem (c): die FAB-Definition. Zum einen setzt diese bestimmte Grenzwerte für den Anteil monozytärer Zellen für die Unterscheidung der verschiedenen FAB-Klassen. Durch die unbestimmbare Beimengung von Blut zur Knochenmarkspore kann aber der monozytäre Anteil im Knochenmark in beide Richtung

unvorhersehbar stark verfälscht werden. Exakte Prozentangaben der monozytären Elemente im Knochenmark sind durchflusszytometrisch zwar messbar, müssen aber keineswegs den Verhältnissen im Mark entsprechen. Zum anderen bezieht die FAB-Klassifikation die Morphologie, die Zytochemie und die Lysozymmessung ein, aber keine Oberflächenantigene. Aus diesen Gründen kann die Durchflusszytometrie zwar eine Aussage zur monozytären Komponente machen, bei diskrepanten Befunden bezüglich der FAB-Klassifizierung kann die

Antigenbestimmung aber per definitionem das Ergebnis der anderen Befunde nicht umstoßen.

AML-M6: Allgemein kann gesagt werden, dass die AML-M6 immunphänotypisch nicht gut definierbar ist. Für die AML-M6 nach FAB-Klassifikation (Erythroblasten machen mehr als 50 % der kernhaltigen Knochenmarkszellen aus; Blasten ≥ 30 % der nicht-erythroiden Zellen¹²) ergibt sich das Problem, dass bei der Probenaufbereitung (Erythrozytenlyse) ein großer Teil der roten Vorstufen verloren gehen kann. Übrig bleiben die Myeloblasten. Es darf daher nicht verwundern, dass viele mikroskopisch als FAB-M6 bezeichnete Fälle in der Durchflusszytometrie als nicht-M6 AML erscheinen. Dies ist methodenbedingt und sollte bei Befunddiskrepanzen berücksichtigt werden. Anders geartet ist die Problematik bei den M6 Fällen (von manchen als AML-M6b oder AML-M6variant bezeichnet^{13; 14}), bei denen die unreifen Zellen (Blasten) selbst Zeichen erythroider Differenzierung zeigen. Diesen Blasten fehlen oft spezifische Marker wie das Glykophorin A¹⁵. Sensitivere Marker wiederum, wie z.B. CD36 sind unspezifisch³. Aber auch in diesen Fällen kann das Muster der Antigenexpression der Blasten die Wahrscheinlichkeit der Diagnose beurteilen helfen.

AML-M7: Für die Diagnose der AML-M7 spielt die Durchflusszytometrie die wichtigste Rolle, da weder morphologische noch zytochemische Eigenschaften pathognomonisch sind und der Nachweis der Plättchenperoxidase technisch sehr schwierig ist³. Megakaryoblasten exprimieren meist CD41 und/oder CD61, wodurch sie leicht erkennbar sind. Beachtet werden muss lediglich, dass an Blasten anhaftende Thrombozyten Megakaryoblasten vortäuschen können. Dies ist aber durch geeignete Maßnahmen zu verhindern oder durch geeignete Zusatzmarker (CD42b: positiv auf reifen Thrombozyten, negativ auf Megakaryoblasten) zu erkennen³.

1.4 Subgruppen der ALL

Die Beschreibung der durchflusszytometrischen Charakteristika der Untergruppen der akuten lymphatischen Leukämien gestaltet sich einfacher, da der Immunphänotyp eine wesentliche Rolle bei der Einteilung der ALL spielt, während die FAB-Klassifikation in den Hintergrund getreten ist.

B-ALL: Die Einteilung der B-ALL Untergruppen erfolgt nach der zytoplasmatischen und der Oberflächenexpression der Immunoglobulin Leichtketten- und IgM-Expression und dem Immunphänotyp, wobei dem Antigen CD10 eine besondere Bedeutung zukommt (siehe Tabelle 2).

Tab. 2. Einteilung der B-ALL nach dem Immunphänotyp

| Antigen | Prä-prä B (pro-B) | common B | prä-B | reife B |
|----------|-------------------|----------|----------|---------|
| zytIgM | - | - | + | - |
| CD10 | - | + | +/- | +/- |
| sIg | - | - | - | + |
| zytCD22 | + | | | |
| CD19 | + | + | + | + |
| HLADR | + | + | + | + |
| CD20 | variabel | variabel | variabel | + |
| CD34 | +/- | +/- | -/+ | - |
| TdT | + | + | + | - |
| CytCD79a | + | + | + | + |

Im wesentlichen folgt die Einteilung der zytoplasmatischen Expression von IgM, die bei der pro-B-ALL und bei der common B-ALL fehlt, und der Expression von CD10, das nur bei letzterer exprimiert wird. Die prä-B-ALL zeigt bereits eine zytoplasmatische IgM-Expression, die reife B-ALL zeigt bereits eine Oberflächeneichtkettenexpression.

T-ALL: Tabelle 3 beschreibt die wichtigsten Marker zur Einteilung der T-ALL. In der Praxis kommen natürlich Übergangsformen bzw. scheinbar nicht zusammenpassende Markerexpressionen vor. Empfehlungen der European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL): CD1a positive T-ALL gilt als common T-ALL unabhängig von der Reaktion von membran-CD3. Die Unterscheidung von α/β -Rezeptor und γ/δ -Rezeptor T-ALL sollte vorgenommen werden ⁴.

1. 5 Sonderfälle der Akuten Leukämie

Die Zellen akuter Leukämien exprimieren relativ häufig auch einzelne Antigene fremder Linien. Man spricht dann z.B. von einer akuten myeloischen Leukämie mit Koexpression lymphatischer Marker oder umgekehrt. Dabei kann es zu Markerexpressionsmustern kommen, bei denen nur mehr schwer entschieden kann, was als Hauptlinie der Leukämie und was als Koexpression zu gelten hat. Die EGIL hat daher Richtlinien zur Klärung dieser Fragen veröffentlicht (Tabelle 4)⁴. Dabei kann es auch dazu kommen, dass die Leukämiezellen letztlich als biphenotypisch, also als zu zwei Linien gehörend, bezeichnet werden müssen. Eine völlig andere Situation liegt bei den sog. bilineären akuten Leukämien vor: diese seltenen Formen zeigen zwei unabhängige Leukämiezellpopulationen, die zu unterschiedlichen Linien (z.B. B-lymphatisch und myeloisch) gehören. Auch diese Form ist durchflusszytometrisch gut zu erkennen. Eine andere Sonderform der Akuten Leukämie ist die akute undifferenzierte Leukämie (AUL), zu deren Definition und Erkennung durchflusszytometrische Befunde entscheidend sind. Modernere Definitionen sprechen von einer AUL beim ausschließlichen Vorhandensein Progenitor-Zell assoziierter Antigene (CD7, CD34, CD117, HLA-DR, TdT)¹⁶.

1.6 Prognose der Akuten Leukämie

Bei der AML wird der Immunphänotyp meist nur benützt

um den Fall in die FAB-Klassifikation zu zwingen. Eine zusätzliche prognostische Information ist dann nicht zu erwarten. Es lassen sich aber aus dem Expressionsmuster verschiedener Antigene Rückschlüsse auf zytogenetische Aberrationen ziehen, wodurch dem Immunphänotyp indirekt in jedem Fall prognostische Bedeutung zukommen. An dieser Stelle sei aber lediglich auf die Original-literatur verwiesen ^{5-10; 17-26}.

Bei der B-ALL hat die durchflusszytometrische Einteilung (Tabelle 2) große Bedeutung für die Prognose. Auch haben verschiedene zytogenetische Formen der B-ALL typische immunphänotypische Besonderheiten, die dadurch ebenfalls prognostische Bedeutung erlangen: Fehlende Expression von CD10 und CD24 bei Expression von CD15 spricht für die meist als 11q23 B-ALL bezeichnete Form mit schlechter Prognose ³. Die prognostisch günstige B-ALL mit der Translokation t(12;21)(p21;q22) zeigt meist eine starke Expression von CD19 und CD10 bei schwacher CD20 und CD9 ²⁷.

Bei der B-ALL mit der Translokation t(12;21)(p21;q22) zeigt meist eine starke Expression von CD19 und CD10 bei schwacher CD20 und CD9 ²⁷.

Tab. 3. Einteilung der T-ALL nach dem Immunphänotyp

| Antigen | Pro T-ALL | Prä T-ALL | kortikale T-ALL | reife T-ALL |
|------------|-----------|-----------|-----------------|-------------|
| nukl.Tdt | + | + | + | +/- |
| HLADR | +/- | - | - | - |
| CD34 | häufig + | | - | - |
| CytCD3 | + | + | +/- | - |
| CD10 | +/- | +/- | -/+ | - |
| CD7 | + | + | + | + |
| CD5 | - | + | + | + |
| CD2 | - | + | + | + |
| CD1a | - | - | + | - |
| CD3 | - | - | -/+ | + |
| CD4 und 8 | - | - | + | - |
| CD4 oder 8 | - | - | möglich | + |

Die Einteilung der T-ALL vor der Stufe der kortikalen T-ALL ist uneinheitlich. So wird z.B. die Unterteilung von Pro T-ALL und Prä T-ALL nicht von allen vorgenommen. Manche sehen den Unterschied der beiden Formen in der CD2-Expression. Die kortikale T-ALL zeigt CD4 und CD8 Koexpression sowie Expression von CD1a. Die reife T-ALL zeigt bereits CD4 oder CD8 und ist CD1a-negativ.

Bei der T-ALL hingegen findet man praktisch keine Korrelationen zwischen zytogenetischen Besonderheiten und Immunphänotyp, auch die Bedeutung der immunphänotypischen Einteilung (Tabelle 3) für die Prognose der T-ALL ist umstritten. Obwohl Studien eine schlechtere Prognose für den unreifen T-Zellimmunphänotyp zeigen ²⁸ wurde vermutet, dass dies in der fälschlichen Zuordnung von unreifen myeloischen Leukämien zu der Gruppe der unreifen T-ALL begründet war ³.

Bei der kindlichen ALL fand man einen Zusammenhang zwischen Prognose und Ploidie der Leukämiezellen: Hyperdiploide Formen zeigten eine bessere Prognose als die selteneren hypodiploiden ^{29; 30}.

Tabelle 4. EGIL-Score für biphänotypische Leukämien ⁴

| Punktewert | B-lymphatisch | T-lymphatisch | Myeloisch |
|------------|--|--|-------------------------------|
| 2 | CD79 (zyt./oberfl.) CD22 (zyt./oberfl.) zyt. IgM | CD3 (zyt./oberfl.) TCR-a/b TCR-g/d | MPO |
| 1 | CD19 CD10 CD20 | CD2 CD5 CD8 CD10 | CD13 CD33 CDw65 |
| 0.5 | TdT CD24 | | CD14 CD15 CD64 CD117 |

"Biphänotypische akute Leukämien" müssen einen Punktwert >2 für die myeloische Reihe *und* eine der lymphatischen Reihen erreichen.

"ALL mit Koexpression myeloischer Antigene" müssen einen Punktwert >2 für eine der lymphatischen Reihen und einen Punktwert ≤ 2 für die myeloische Reihe erreichen.

"AML mit Koexpression lymphatischer Antigene" müssen einen Punktwert >2 für die myeloische Reihen und einen Punktwert ≤ 2 für die lymphatischen Reihen erreichen.

1.7 Verlaufskontrollen der Akuten Leukämie

Die Sensitivität der durchflusszytometrischen Verlaufskontrolle von akuten Leukämien hängt vom Phänotyp der malignen Zellen ab. Je mehr sich dieser von dem normaler Zellen unterscheidet und je geringer die Anzahl der Zellen ist, die im gesunden Knochenmark/Blut den gleichen Phänotyp haben, desto empfindlicher ist die durchflusszytometrische Verlaufskontrolle. Prinzipiell werden vor allem folgende Eigenschaften zur Verlaufsbeobachtung genutzt: abnorme quantitative Antigenexpressionen (abnorm stark oder schwach), asynchrone (reife und unreife Marker auf derselben Zelle) und aberrante Antigenexpression (d.h. das Auftreten von nicht zu der Zelllinie gehörigen Antigenen oder das Fehlen von Antigenen). Dabei werden in der Literatur Sensitivitäten von bis zu unter 0.01% (1 Zelle unter 10000) angegeben ³¹⁻³³. Wenn dies auch in Einzelfällen erreichbar sein mag, liegt nach unserer Erfahrung ein realistisches Limit bei vertretbarem analytischen Aufwand für die meisten Fälle akuter Leukämien höher. Es sind dabei verschiedene Probleme zu beachten: (a) Die Leukämiezellen können einen von normalen Zellen nur schwer zu unterscheidenden Immunphänotyp haben. (b) Der vermeintlich Leukämie-typische Immunphänotyp kann im krankheits- oder therapiebedingt veränderten Mark auch auf normalen Zellen vorkommen ³⁴. (c) Man muss mit dem Wechsel des Immunphänotyps im Verlauf hämatologischer Erkrankungen rechnen ^{31: 35}. Eine Entscheidung über das Vorhandensein einer Residualpopulation der akuten Leukämie bedarf daher meist einiger Erfahrung und ist in manchen Fällen relativ unsensibel. Dies sollte im durchflusszytometrischen Befund zum Ausdruck gebracht werden. Trotz all dieser Einschränkungen ist die durchflusszytometrische Suche nach einer residualen Zellpopulation in den meisten Fällen weit sensitiver als die mikroskopische Untersuchung und einfacher und schneller als die molekularbiologische Analyse.

1.8 Das Problem der Knochenmarksverdünnung

Es ist nicht möglich, durch eine durchflusszytometrische

Untersuchung exakte Angaben über die quantitativen Verhältnisse im Knochenmark zu machen. Schon bei der Entnahme des Knochenmarks wird dem Mark eine unbestimmte Menge peripheren Blutes beigemischt. Die Konzentrationen aller Zellpopulationen werden dadurch verändert. Da die bei Verlaufskontrollen von akuten Leukämien interessierenden Zellen meistens im Blut in geringerer Konzentration vorhanden sind als im Knochenmark, führt eine Blutbeimengung im allgemeinen zu einer Unterschätzung des Anteils dieser Zellen im Knochenmark. Man wird daher durchflusszytometrisch meist einen geringeren Blastenanteil finden als mikroskopisch. Diese quantitative Diskrepanz fällt besonders im Vergleich zu Zählungen aus Knochenmarksstanzen auf, während die Differenzen zu Zählungen von Knochenmarksausstrichen kleiner sind, da diese ja auch (wenn auch in geringerem Ausmaß) unter dem Verdünnungsproblem leiden. Das Problem wird durch die leider gängige Praxis aggraviert, die letzte Portion der Knochenmarksentnahme für die durchflusszytometrische Untersuchung zu verwenden. Diese Portion zeigt natürlich die größte Blutbeimengung. Näheres zu methodischen Problemen unter ^{36; 37}.

2. MYELOPROLIFERATIVE SYNDROME

Je nach Einteilung werden dazu die Chronisch Myeloische Leukämie, die Polyzythämia Vera, die Essentielle Thrombozythämie, die Osteomyelofibrose, ev. auch Formen der Chronisch Myelomonozytären Leukämie gerechnet.

Die Bedeutung der Durchflusszytometrie bei der Diagnose dieser Erkrankungen ist äußerst gering. Man kann durchflusszytometrisch den Anteil der unreifen Zellen (Blasten) bestimmen, was aber in vielen Fällen mikroskopisch zumindest ebenso klar möglich sein wird. Da hämatologische Analysenautomaten die Basophilen meist nur unzuverlässig bestimmen, kann der Anteil durchflusszytometrisch exakt ermittelt werden, was in manchen Fällen eine gewisse diagnostische Zusatzinformation bringen mag. Auch diese Bestimmung kann aber mikroskopisch erfolgen. Größere Bedeutung kommt der Durchflusszytometrie beim Auftreten einer Blastenkrise zu, bei der die Linie der Blasten zu bestimmen ist.

3. MYELOYDYSPLASTISCHES SYNDROM (MDS)

Für die Diagnose des MDS ist die Bedeutung der Durchflusszytometrie eher gering. Es wurden zwar verschiedene Kennzeichen wie z.B. ein niedriges Seitwärtsstreulichtsignal und verminderte Expression mancher Antigene (u.a. CD10, CD16) auf den neutrophilen Granulozyten publiziert ^{3; 38}, die Sensitivität aber auch die Spezifität und damit der Nutzen dieser Befunde sind aber noch zu hinterfragen. So findet man z.B. CD16 auf Neutrophilen Granulozyten auch bei entzündlichen Veränderungen vermindert ausgeprägt ³⁹. Eine durchflusszytometrische Untersuchung bei Verdacht auf MDS dient daher eher dem Ausschluss anderer Ursachen der hämatologischen Besonderheiten.

Was die Einteilung der MDS Formen betrifft, kann man mit der Durchflusszytometrie den Blastenanteil im Blut meist exakt bestimmen. Auch im Knochenmark ist eine Bestimmung möglich, dabei ist aber das oben beschriebene Problem der Blutverdünnung zu beachten.

4. NON-HODGKIN LYMPHOME VOM B-ZELLTYP (B-NHL)

4.1 Diagnose der B-NHL

Die Diagnose von monoklonalen B-lymphoproliferativen Erkrankungen ist eine Domäne der Durchflusszytometrie. Durch den Nachweis der Expression nur einer Leichtkette (Kappa oder Lambda) auf einer B-Zellpopulation ist die Monoklonalität praktisch gesichert (Abbildung 2). Durch

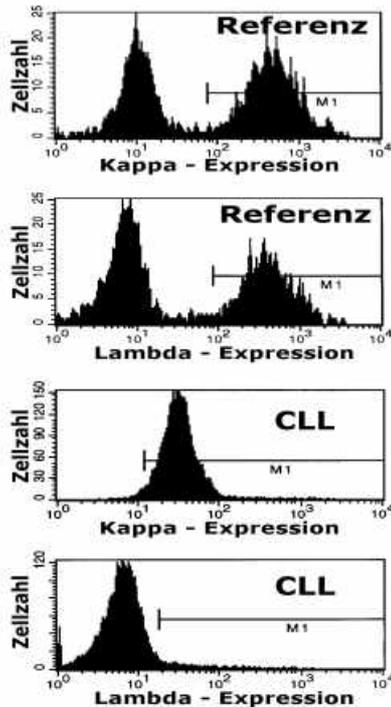


Abb. 2. Leichtkettenexpression der B-Zellen.

Die Histogramme zeigen die Verteilung der B-Zellen bei Markierung der Leichtketten. In den beiden oberen Referenzdiagrammen sieht man die normale, zweigipfelige Verteilung, die für eine polyklonale B-Lymphozytenpopulation spricht. Darin finden sich die Kappa- oder Lambda-positiven B-Zellen. Die zwei unteren Histogramme zeigen die B-Zellen einer Chronisch Lymphatischen Leukämie, die lediglich Kappa exprimieren, was ein Zeichen für Monoklonalität dieser B-Zellpopulation ist. Als weitere Besonderheit ist die Expression von Kappa schwächer als auf normalen B-Zellen.

die Kombination mit anderen Markern zur Isolierung der pathologischen Zellen können auch minimale Populationen (in manchen Fällen bis 0.1 % der Leukozyten und darunter) trotz Anwesenheit einer überwiegend polyklonalen, normalen B-Zellpopulation oder in lymphopenischen Proben eindeutig nachgewiesen werden. Auch das gleichzeitige Vorhandensein zweier B-NHL kann meist nachgewiesen werden (Abbildung 3). Die Durchflusszytometrie ist darin der immunhistologisch-pathologischen Untersuchung weit überlegen. Diskrepante Befunde sind daher nicht selten. Es muss aber natürlich betont werden, dass die Bedeutung einer solch geringen monoklonalen B-Zellpopulation im klinischen Kontext beurteilt werden muss. Sie mag den entscheidenden Hinweis bei vorhandener klinischer Symptomatik geben, mag aber auch nur Begleitphänomen sein. In jedem Fall steht mit der Durchflusszytometrie eine hochempfindliche Methode zum Nachweis monoklonaler B-Zellveränderungen zur Verfügung.

4.2 Untergruppen der B-NHL

In den meisten Fällen liefert die Durchflusszytometrie einen wertvollen Beitrag nicht nur zur Erkennung sondern auch zur Definition des B-NHL.

4.2.1 B-CLL

Diese häufigste aller Leukämieformen hat ein durchflusszytometrisch oft eindeutiges Muster: CD19-positive B-Zellen, die CD20 schwach, CD79b negativ, Leichtkette (Kappa oder Lambda) schwach, CD5 positiv und CD23 positiv sind. Atypische CLL: Manche Formen der B-CLL weichen von diesem typischen Muster ab und werden fallweise als atypische CLL bezeichnet. Diese Aussage sollte auf den Immunphänotyp eingeschränkt werden, da der Begriff „atypische CLL“ morphologisch besetzt ist.

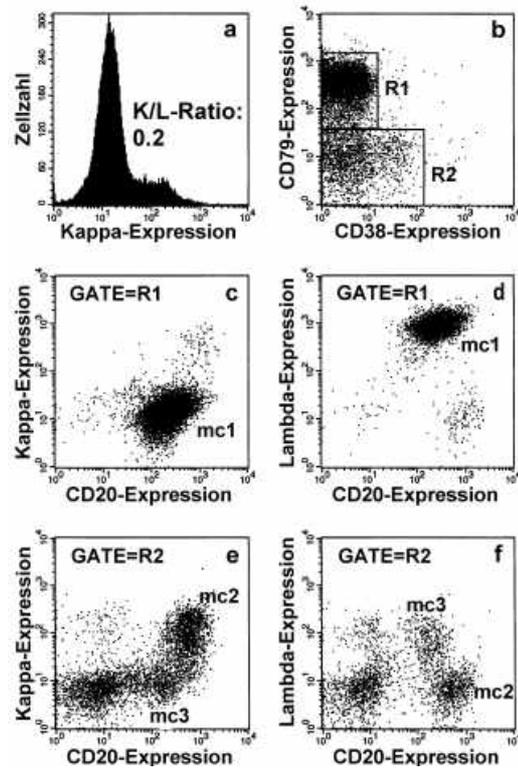


Abb. 3. Erkennung von Mehrfachlymphomen durch 4-Farbenanalyse.

80-jährige Frau, Lymphozytose, Paraprotein IgM-kappa. Die Kappa/Lambda-Ratio der B-Zellen mit 0.2 auffällig aber nicht konklusiv (a). In der CD38/CD79 Darstellung teilen sich die B-Zellen in zwei Gruppen (b). Bei Analyse der Zellen aus Region R1 zeigt sich eine dominierende Lambda-monoklonale Population mc1 (c und d). Bei Analyse der Zellen aus Region R2 zeigt sich eine stark CD20 exprimierende, Kappa-monoklonale Population mc2 (e und f). Eine dritte Lambda-monoklonale Population (mc3) mit schwacher CD20-Expression aber auch schwacher Expression von Lambda wird ebenfalls deutlich (e und f). Population mc1 und mc3 könnten die gleiche Tumorphänomen darstellen, Population mc2 aber zeigt eine andere Leichtkette. Immunhistologisch sind derartige Differenzierungen unmöglich.

Prognosefaktoren bei CLL: Es wurden verschiedene prognostische Faktoren beschrieben, die sich aus der Immunphänotypisierung ableiten lassen. Leider sind die Ergebnisse nicht einheitlich.^{40; 41} Neuere Ergebnisse mehrerer unabhängiger Gruppen lassen auf schlechte Prognose bei CD38-Expression schließen⁴²⁻⁴⁵.

Korrelationen zur Zytogenetik: Eine rezente Studie be-

schreibt signifikant schlechtere Prognosen für die Aberrationen 17p und 11q⁴⁶, frühere Studien deuteten auf schlechtere Prognosen für die Trisomie 12 hin. Für die Durchflusszytometrie stellt sich die Frage, wie man diese Veränderungen aus dem Immunphänotyp vorhersagen kann? Für die Trisomie 12 ist eine stärkere CD20, FMC7, CD11a, CD38 und stärkere Leichtkettenexpression Expression⁴⁷⁻⁴⁹, sowie das Fehlen von CD23 beschrieben⁴⁸. Sembries et al. konnten zeigen, dass CLL-Fälle mit 11q-Deletion eine signifikant niedrigere Expression von Adhäsionsmolekülen aufwiesen und darüber hinaus weniger CD45, CD6, CD35 und CD39 exprimierten. Die verminderte Expression von CD45 und eine Expression von CD49d korrelierten mit vermindertem Überleben. Bis auf CD45 und CD11c werden die in der Studie untersuchten Marker aber nur selten in der Routine gemessen. Nicht selten werden Proben mit der Verdachtsdiagnose Richter-Syndrom eingesandt. Oft nur peripheres Blut, seltener auch Knochenmark. Obwohl es möglich ist, dass beim Richter-Syndrom abnorme, von den CLL-Zellen unterscheidbare Zellen ausgeschwemmt werden, sollte man sich im Falle eines negativen Befundes der geringen Wahrscheinlichkeit einer Ausschwemmung bewusst sein.

4.2.2 Andere B-BHL

Die Haarzelleleukämie zeigt einen meist typischen Immunphänotyp: CD20 stark, CD103 positiv, CD11c außerordentlich stark positiv und CD25 positiv (stärker als bei CLL). Die Leichtkettenexpression ist stärker als bei CLL aber schwächer als bei PLL^{50:51}. Meist lässt die Typisierung in Zusammenschau mit dem Blutbild eine eindeutige Diagnose zu.

Das Mantelzelllymphom (MCL, cc-Lymphom) ist wie die CLL meist CD5 positiv, im Gegensatz zur CLL zeigt es aber eine stärkere Expression von CD20, von Oberflächenleichtketten und ist CD23 negativ. Durchflusszytometrisch kann der Verdacht auf MCL ausgesprochen werden, der Verdacht sollte aber durch morphologische und/oder zytogenetische Befunde abgesichert werden.

Auch das Follikelzentrumszell Lymphom (FCL, Follikuläres Lymphom, cc/cb-Lymphom) kann ausschwemmen. Typischer Immunphänotyp: CD10 positiv (ca. 85% der Fälle), CD5 negativ. Die Leichtketten sind unterschiedlich stark exprimiert und können leider auch ganz fehlen. Analysiert man Lymphknoten, kann man bei Fehlen der Leichtkettenexpression die Monoklonalität nicht mehr beweisen und hat eventuell Schwierigkeiten, reaktive Veränderungen von malignen abzugrenzen. Ein zytoplasmatischer Nachweis von Bcl-2 in den B-Zellen (bei FCL stark exprimiert, bei reaktiven Follikelzentrumszellen fehlend) kann dann weiterhelfen⁵². Aus der durchflusszytometrischen Untersuchung des peripheren Blutes, kann bei entsprechendem Immunphänotyp der Verdacht auf FCL ausgesprochen werden, der Verdacht sollte aber durch morphologische und/oder zytogenetische Befunde abgesichert werden.

Die Prolymphozytenleukämie besitzt keinen eindeutigen Immunphänotyp. Eine Abgrenzung gegen andere B-NHL muss klinische und morphologische Befunde miteinbeziehen. Ähnliches gilt für das Marginalzonenlymphom (inklusive des Splenic Lymphoma with Villous Lymphocytes - SLVL) und das Immunozytom.

4.3 Feststellung der Malignitätsgrades

Bei nicht wenigen Fällen kann der Immunphänotyp keinen sicheren Hinweis auf die Entität des vorliegenden B-NHL liefern. Dennoch kann durch Bestimmung der Proliferati-

onsrate mittels DNA-Zellzyklusanalyse oft eine Einteilung in niedrig oder hochmaligne Formen getroffen werden. Dazu sollte aber Lymphknotenmaterial untersucht werden, da man die Proliferationsrate bei Analyse von Blut aber auch von Knochenmark deutlich unterschätzen kann (Abbildungen 4 und 6).

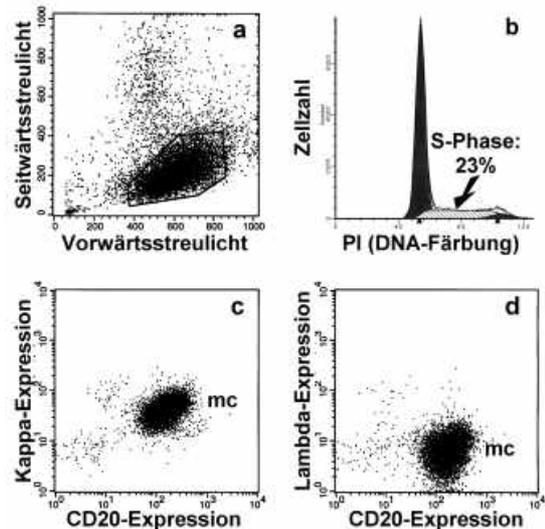


Abb. 4. Immunphänotypisierung von Aszites.

Die Untersuchung von Aszites zeigt eine großzellige B-Zellpopulation (a), die sich in der Leichtkettendarstellung als monoklonal erwies (c und d). Die Zellzyklusanalyse (b) zeigt den hohen Anteil proliferierender Zellen (S-Phase 23%; PI=Propidiumjodid). Großzelliges, hochmalignes B-Zelllymphom.

4.4. Verlaufsuntersuchungen

Auch für die Verlaufskontrolle von B-NHL ist die Durchflusszytometrie aufgrund ihrer hohen Sensitivität und der im Vergleich zur Molekularbiologie einfachen Durchführung sehr gut geeignet. Das Problem entsteht eher für den Kliniker, der entscheiden muss, wie kleinste Populationen zu bewerten sind

4.5 Multiples Myelom/MGUS/SMM

Obwohl die Immunphänotypisierung nicht zu den üblichen Diagnosekriterien des Multiplen Myeloms (MM) gehört, kann sie zu dessen Diagnose einen wertvollen Beitrag liefern. So kann der Einsatz weniger Marker in vielen Fällen eine Unterscheidung zwischen abnormalen und normalen Plasmazellen ermöglichen (CD19, CD56, CD20, CD138, CD38, eventuell CD10, CD22, CD28)⁵³. Dazu parallel kann man durch die Messung der zytoplasmatischen Leichtkettenexpression die Klonalität der Plasmazellpopulation beurteilen. Dies gelingt auch bei Plasmazellpopulation, die weniger als 1% der Leukozyten ausmachen. Diese Befunde helfen, reaktive Plasmazellvermehrungen von nicht reaktiven zu unterscheiden⁵⁴. Man hat damit aber noch keine Abgrenzung zur monoklonalen Gammopathie mit undeterminierter Signifikanz (MGUS), da auch bei dieser klonale Plasmazellen mit abnormem Immunphänotyp vorhanden sind^{53:55}. Ein wichtiges Kriterium zur Abgrenzung des MGUS vom MM soll aber der Anteil der monoklonalen Zellen sein: Bei nur 1.5% aller Myelome, aber bei 98% aller MGUS-Fälle machen die normalen, polyklonalen Plasmazellen mehr als 3% aller Plasmazellen aus⁵⁵. Eine rezente Arbeit bestätigte diese Ergebnisse. Die Autoren fanden bei MM praktisch alle Plasmazellen des

Marks pathologisch ($99 \pm 8 \%$), während beim MGUS der Anteil pathologischer Plasmazellen stark schwankend aber meist niedriger war ($35 \pm 33 \%$).

Für die Unterscheidung des sog. Smoldering Multiple Myeloma (SMM) und des MM kann die S-Phase herangezogen werden. Bei SMM ist die Proliferationsrate meist niedrig. Findet man eine hohe S-Phase spricht es für ein MM. Es gibt aber eindeutig Myelome mit niedriger S-Phase (ca. 40% der Fälle, ⁵⁴). Bei diesen kann eventuell die durchflusszytometrische Bestimmung der Plasmazellen im peripheren Blut helfen. Diese ist durchflusszytometrisch einfach und exakt möglich. SMM zeigen meist keine oder nur sehr wenige Plasmazellen im peripheren Blut, während bei 80% aller MM eine Erhöhung feststellbar ist ⁵⁴.

Eine eingeschränkte Bedeutung hat die Durchflusszytometrie für die Zählung der Plasmazellen im Knochenmark: Zellverluste durch Verdünnung mit peripherem Blut bei der Materialgewinnung und Verluste bei der Aufbereitung führen dazu, dass der Anteil der Plasmazellen an den Knochenmarkszellen durchflusszytometrisch meist falsch niedrig eingeschätzt wird ⁵⁶. Eine falsch hohe Plasmazellzahl ist prinzipiell nicht zu erwarten.

Prognose: das durchflusszytometrische Pendant zum Labeling Index ist der Anteil der Plasmazellen in der S-Phase, bestimmt mittels DNA-Zellzyklusanalyse. Eine schlechtere Prognose wurde für Myelome mit einem S-Phase-Anteil von mehr als 3 % beschrieben ⁵⁷. Einen ausreichenden Anteil von Plasmazellen in der Probe vorausgesetzt, kann dieser Parameter der Prognoseeinschätzung dienen.

Verlaufsuntersuchung: Wenn die durchflusszytometrische Zählung des Anteils der Plasmazellen im Knochenmark auch unzuverlässig ist, kann der Anteil der abnormen Plasmazellen an der Gesamtzahl der Plasmazellen genau bestimmt werden, was wiederum mikroskopisch kaum quantifizierbar ist. Aus der Kombination des mikroskopischen Ergebnisses mit dem durchflusszytometrischen ergibt sich dadurch ein klares Bild des Anteils der Residualpopulation.

5. NON-HODGKIN LYMPHOME VOM T-ZELLTYP (T-NHL)

Im Vergleich zu den B-Zelllymphomen ist die Sensitivität und Spezifität der Durchflusszytometrie weit geringer, da ein effizienter Monoklonalitätsnachweis noch nicht etabliert ist ⁵⁶. Man stützt sich bei der Erkennung maligner T-Zellen auf den Nachweis abnormer Verteilungen und/oder eine abnorme Antigenexpressionen der T-Zellen (Beispiel Abbildung 5). Dies wird aber dadurch erschwert, dass einerseits nicht alle malignen T-Zellerkrankungen einen abnormen Phänotyp haben, und andererseits auch bei nicht malignen Erkrankungen oder beim Gesunden asymmetrische Verteilungen und relativ hohe Konzentrationen von "abnormen" T-Zellen vorkommen. Daher können erst größere Abweichungen vom Normalbefund als signifikanter Hinweis auf eine lymphoproliferative Erkrankung gewertet werden. Die Durchführung einer durchflusszytometrischen Untersuchung bei Verdacht auf T-Zelllymphom/chronische T-Zelleukämie ist dennoch sinnvoll, man muss aber mit falsch negativen Befunde rechnen. Wird nur peripheres Blut untersucht, kommt natürlich noch hinzu, dass Lymphome in vielen Fällen nicht oder kaum ausschwemmen. Sollte durchflusszytometrisch der Verdacht auf eine klonale T-Zellproliferation bestehen, kann dieser molekularbiologisch abgeklärt werden.

Steht die Diagnose (T-Zell)lymphom durch andere Befunde fest, kann die Durchflusszytometrie Hinweise auf die

exakte Definition der Erkrankung und damit auf die Prognose liefern. Bezüglich Verlaufskontrollen von T-Zellproliferationen gilt das für die Diagnose Gesagte: Liegt ein abnormer Immunphänotyp vor, kann die durchflusszytometrische Verlaufskontrolle sehr sensibel sein (Populationsdichten unter 1% können erkannt werden).

In ungünstigen Fällen kann die Sensitivität weit schlechter sein. Der durchflusszytometrische Befund sollte dies zum Ausdruck bringen.

Natural Killer Cell (NK) / Large Granular Lymphocyte (LGL) - Proliferationen: Studien, die immunphänotypische Besonderheiten maligner NK/LGL-Zellen beschreiben,

sind uneinheitlich und nicht überzeugend. Die Durchflusszytometrie kann die NK-Zellen erkennen und quantifizieren, eine Unterscheidung bezüglich der Dignität aus dem Immunphänotyp ist aber meist nicht möglich. Leider ist in diesen Fällen auch molekularbiologisch manchmal keine Abklärung möglich.

Die durchflusszytometrische Untersuchung von Lymphknoten, die in manchen Zentren zurecht zur Routine bei jeder Lymphknotenbiopsie gehört, wird unverständlicherweise relativ selten eingesetzt. Ein Beispiel einer Immunphänotypisierung einer Lymphknotenbiopsie zeigt Abbildung 6.

5. MORBUS HODGKIN

Der Morbus Hodgkin ist mit derzeit üblichen Markern und Methoden durchflusszytometrisch nicht nachweisbar. Er wird an dieser Stelle nur erwähnt, um Fehleinsendungen und Fehlinterpretationen durchflusszytometrisch negativer Befunde zu vermeiden.

6. UNTERSUCHUNG VON BIOPSIEMATERIAL

Obwohl die Durchflusszytometrie eine fast ideale Methode zur Beurteilung von Biopsiematerial darstellt wird sie in vielen Ländern kaum dazu eingesetzt. Auch die durchflusszytometrische Untersuchung von Lymphknoten, die in manchen Zentren zurecht zur Routine bei jeder Lymphknotenbiopsie gehört, wird unverständlicherweise relativ selten eingesetzt. Ein Beispiel einer Immunphänotypisierung einer Lymphknotenbiopsie zeigt Abbildung 6.

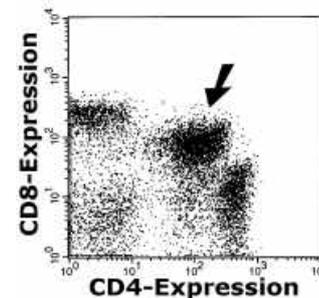


Abb. 5. Abnorme Antigenexpression bei T-NHL.

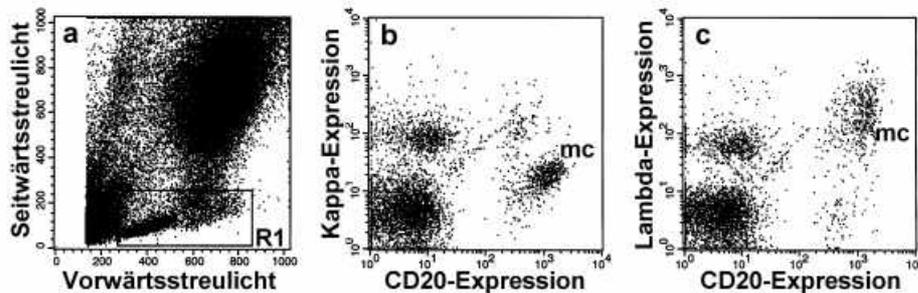
Die abnormen Zellen (Pfeil) zeigen neben der Koexpression von CD4 und CD8 auch eine im Vergleich zu den normalen Zellen verminderte Expression von CD4 und CD8.

Zahllose Studien haben gezeigt, dass die Durchflusszytometrie (selbst in Feinnadelbiopsien) neoplastische Populationen erkennen kann, die zytologisch nicht detektierbar waren: ⁵⁸⁻⁶⁰. Bei Hautbiopsien von CTCL ⁶¹ und bei Biopsien von pulmonalen MALT-Lymphomen ⁶² lieferte die Durchflusszytometrie wertvolle Ergebnisse. Bei einer Studie über Magenlymphome konnten morphologisch nur 50 % aller durchflusszytometrisch eindeutig erkennbaren monoklonalen B-Zellproliferationen erkannt werden ⁶³. Auch zwei neuere Studien belegen den Wert der Durchflusszytometrie für die Untersuchung von Feinnadelbiopsien peripherer T-Zelllymphome ⁶⁴ und bei Feinnadelbiopsien im Kopfhalsbereich ⁶⁵. Die letztere Studie sieht sogar eine deutli-

chen unreif, könnte durchflusszytometrisch ein abnormer Immunphänotyp nachweisbar sein. Bei reinen Neutrophilien, Eosinophilien oder Basophilien ist eine Immunphänotypisierung meist nicht zielführend.

Leukopenie/Panzytopenien: Bei Leukopenien, Bi- oder Panzytopenien ohne offensichtliche Ursache kann eine durchflusszytometrische Untersuchung angezeigt sein. Ausschwemmende Lymphome (z.B. eine Haarzelleukämie) oder eine Vermehrung unreifer Zellen können durch ein Screening-Panel erfasst werden. Ein negativer Befund schließt nicht ausschwemmende Lymphome natürlich nicht aus. Bezüglich Myelodysplastischen Syndromen siehe entsprechenden Abschnitt.

KNOCHENMARK



LYMPHKNOTENBIOPSIE

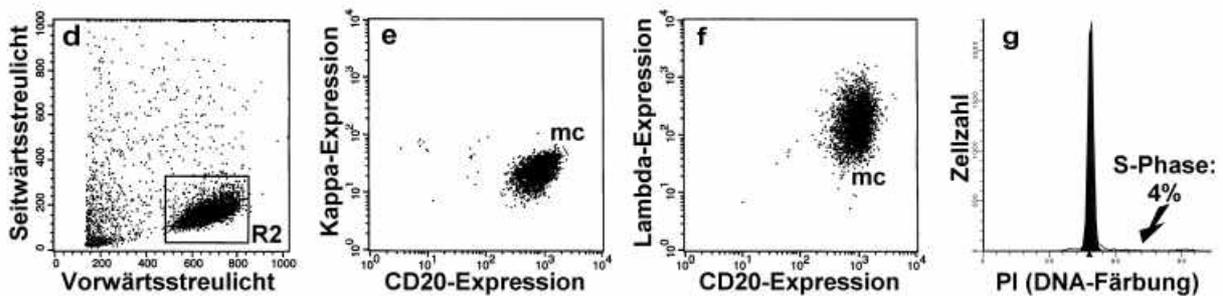


Abb. 6. Immunphänotypisierung von Knochenmark und Lymphknotenbiopsie bei B-NHL.

Während die monoklonale NHL-Population (mc) im Knochenmark nur klein und dementsprechend undeutlich erkennbar ist (a-c), ist sie im Lymphknoten dominierend und eindeutig identifizierbar (d-f). Ein dadurch mögliche Zellzyklusanalyse (g) zeigt einen niedrigen Anteil proliferierende Zellen (S-Phase 4%). Niedrigmalignes B-Zelllymphom. Die durchflusszytometrische Analyse von Biopsiematerial stellt eine wesentliche Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten dar.

che Überlegenheit der Durchflusszytometrie gegenüber der Zytologie für die Erkennung von NHL. Eine bessere Zusammenarbeit zwischen klinischer Abteilung, biopsierendem Arzt, Pathologie und der durchflusszytometrischen Abteilung wäre dringend notwendig.

7. INDIKATIONEN FÜR DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN

7.1 Quantitative Veränderungen des Blutbildes

Leukozytose: Zuerst sollte die die Leukozytose verursachende Population identifiziert werden. Ist diese nicht eindeutig definierbar, ist eine Immunphänotypisierung angezeigt. Beruht sie auf einer Erhöhung der Lymphozyten ist die Durchflusszytometrie ebenfalls die Methode der Wahl. Ein unauffälliger Befund bei deutlicher Lymphozytose macht ein ausschwemmendes Lymphom äußerst unwahrscheinlich. Bei Monozytosen, die durch reife, morphologisch normale Monozyten verursacht ist, ergibt sich durch die Typisierung meist keine Zusatzinformation in Bezug auf hämatologische Erkrankungen. Sind die Mono-

Polyglobulie/Anämie: Isolierte, quantitative Veränderungen des roten Blutbildes werden selten Anlass für eine durchflusszytometrische Untersuchung sein (Polyzythämia Vera siehe Abschnitt 2).

Thrombozytose/Thrombopenie: eine Thrombopenie unbekannter Ursache mag im Einzelfall ein durchflusszytometrisches Screening rechtfertigen, eine isolierte Thrombozytose kaum.

7.2 Qualitative Veränderungen des Blutbildes

Linksverschiebung: Eine reaktive Linksverschiebung ist durchflusszytometrisch durch Messung verschiedener Aktivierungsmarker nachvollziehbar ³⁹, die Unterscheidung von einer nicht reaktiven Linksverschiebung ist aber morphologisch meist einfacher. Bei nicht reaktiven Linksverschiebungen ist die Information durch die Immunphänotypisierung eher gering (siehe Abschnitt 2).

Atypische Lymphozyten: Beim Auftreten von atypischen oder als aktiviert eingestuften Lymphozyten ohne offensichtliche Ursache kann ein durchflusszytometrisches Lymphomsuchpanel durchgeführt werden. Bei einem

solchen werden meist auch der Aktivierungszustand der T-Zellen (gesteigert bei Virusinfektion) und das Vorhandensein unreifer Zellen und Plasmazellen überprüft. Auch bei Verdacht auf Haarzellen oder andere Lymphomzellen ist der Einsatz eines Lymphomsuchpanels sinnvoll.

Plasmazellen: Bei dem Verdacht auf oder dem Vorliegen von Plasmazellen im peripheren Blut kann die Durchflusszytometrie dies verifizieren und im positivem Fall eine Leichtkettenuntersuchung anschließen, um zwischen polyklonaler (reaktiver) und monoklonaler Plasmazellvermehrung zu unterscheiden.

Blasten: Mikroskopische Blastenbefunde können durchflusszytometrisch bestätigt werden. Ein hoher Blastenanteil im Blut wird direkt zu einer Linientypisierung führen (siehe Abschnitt akute Leukämien).

Rotes Blutbild: Qualitative Veränderungen des roten Blutbildes und kernhaltige rote Vorstufen werden für sich kaum eine Indikation für eine durchflusszytometrische Untersuchung sein.

7.3 Andere Symptome

Unklare Raumforderungen, Splenomegalie und Lymphknotenschwellungen stellen häufige Zuweisungsdiagnosen dar. Wichtig ist, im Falle eines negativen Ergebnisses die Diagnose einer hämatologischen Neoplasie nicht zu verwerfen. Lymphome, die nicht ausschwimmen, T-Zelllymphome, die nicht ausschwimmen, oder T-Zelllymphome mit unauffälligem Immunphänotyp, die gering ausschwimmen, sind nicht nachweisbar. Auch bei der Fragestellung MALT-Lymphom oder Kutanes T-Zelllymphom (CTCL) muss berücksichtigt werden, dass diese Formen selten ausschwimmen. Morbus Hodgkin ist durchflusszytometrisch überhaupt nicht nachweisbar. In vielen Fällen wäre es sinnvoll, anstelle von Blut oder Knochenmark Biopsiematerial durchflusszytometrisch zu untersuchen, was aber häufig unterbleibt (siehe Abschnitt Untersuchung von Biopsiematerial).

Unklare Fälle von Hämolyse und/oder Thrombosen könnten eine Indikation für eine Untersuchung auf paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) darstellen. Die PNH ist durchflusszytometrisch sehr gut nachweisbar und, im Gegensatz zu anderen Methoden, auch quantifizierbar.

Diese Zusammenfassung sollte zeigen, wie vielfältig die Möglichkeiten der Durchflusszytometrie sind und gleichzeitig darlegen, dass das Wissen um die Möglichkeiten und Grenzen der Methode sowohl die Indikationsstellung als auch die Interpretation der Befunde optimiert, wodurch der Wert der Methode noch deutlich erhöht wird.

LITERATUR

1. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT: Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am.J Clin.Pathol.* 100:534, 1993
2. Lacombe F, Durrieu F, Briais A, Dumain P, Belloc F, Bascans E, Reiffers J, Boisseau MR, Bernard P: Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 11:1878, 1997
3. Weir EG, Borowitz MJ: Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. *Se-min.Hematol.* 2001.Apr.;38(2.):124.-38. 38:124,
4. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD,

Matutes E, Orfao A, van't Veer MB: Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL).* *Leukemia* 9:1783, 1995

5. Porwit-MacDonald A, Janossy G, Ivory K, Swirsky D, Peters R, Wheatley K, Walker H, Turker A, Goldstone AH, Burnett A: Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. IV. CD34 overexpression in acute myelogenous leukemia M2 with t(8;21). *Blood* 87:1162, 1996

6. Creutzig U, Harbott J, Sperling C, Ritter J, Zimmermann M, Löffler H, Riehm H, Schellong G, Ludwig WD: Clinical significance of surface antigen expression in children with acute myeloid leukemia: results of study AML-BFM-87. *Blood* 86:3097, 1995

7. Edwards RH, Wasik MA, Finan J, Rodriguez R, Moore J, Kamoun M, Rennert H, Bird J, Nowell PC, Salhany KE: Evidence for early hematopoietic progenitor cell involvement in acute promyelocytic leukemia. *Am.J Clin.Pathol.* 112:819, 1999

8. Exner M, Thalhammer R, Kapiotis S, Mitterbauer G, Knobl P, Haas OA, Jager U, Schwarzingger I: The "typical" immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL-M3): does it prove true for the M3-variant? *Cytometry* 2000.Apr.15.;42(2.):106.-9. 42:106,

9. Biondi A, Luciano A, Bassan R, Mininni D, Specchia G, Lanzi E, Castagna S, Cantu-Rajnoldi A, Liso V, Masera G: CD2 expression in acute promyelocytic leukemia is associated with microgranular morphology (FAB M3v) but not with any PML gene breakpoint. *Leukemia* 9:1461, 1995

10. Guglielmi C, Martelli MP, Diverio D, Fenu S, Vegna ML, Cantu-Rajnoldi A, Biondi A, Cocito MG, Del Vecchio L, Tabilio A, Avvisati G, Basso G, Lo CF: Immunophenotype of adult and childhood acute promyelocytic leukaemia: correlation with morphology, type of PML gene breakpoint and clinical outcome. A cooperative Italian study on 196 cases. *Br.J Haematol.* 102:1035, 1998

11. Piedras J, Lopez-Karpovitch X, Cardenas R: Light scatter and immunophenotypic characteristics of blast cells in typical acute promyelocytic leukemia and its variant. *Cytometry* 32:286, 1998

12. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann.Intern.Med.* 103:620, 1985

13. Flandrin G: The Classification of Acute Myeloid Leukaemias (AML) and Myelodysplastic Syndromes (MDS), in Catovsky D, Flandrin G, Diebold J, Mason DY (eds): *The 6th European Tutorial on Hematopathology*, London, European School of Haematology, 1996, p 1

14. Kowal-Vern A, Cotelingam J, Schumacher HR: The prognostic significance of proerythroblasts in acute erythroleukemia. *Am.J Clin.Pathol.* 98:34, 1992

15. Garand R, Duchayne E, Blanchard D, Robillard N, Kuhlein E, Fenneteau O, Salomon-Nguyen F, Grange MJ, Rousselot P, Demur C: Minimally differentiated erythroleukaemia (AML M6 'variant'): a rare subset of AML distinct from AML M6. *Groupe Francais d'Hematologie Cellulaire.* *Br.J Haematol.* 90:868, 1995

16. Ludwig WD: Immunphänotypisierung akuter lymphatischer und akuter myeloischer Leukämien, in Thomas L (ed): *Labor und Diagnose*, Frankfurt/Main, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998, p 551

17. Menell JS, Cesarman GM, Jacovina AT, McLaugh-

hlin MA, Lev EA, Hajjar KA: Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia [see comments]. *N.Engl.J Med.* 340:994, 1999

18. Adriaansen HJ, te BP, Hagemeyer AM, van der Schoot CE, Delwel HR, van Dongen JJ: Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood* 81:3043, 1993

19. Baer MR, Stewart CC, Lawrence D, Arthur DC, Mrozek K, Strout MP, Davey FR, Schiffer CA, Bloomfield CD: Acute myeloid leukemia with 11q23 translocations: myelomonocytic immunophenotype by multiparameter flow cytometry. *Leukemia* 12:317, 1998

20. Hurwitz CA, Raimondi SC, Head D, Krance R, Mirro JJ, Kalwinsky DK, Ayers GD, Behm FG: Distinctive immunophenotypic features of t(8;21)(q22;q22) acute myeloblastic leukemia in children. *Blood* 80:3182, 1992

21. Schachner J, Kantarjian H, Dalton W, McCredie K, Keating M, Freireich EJ: Cytogenetic association and prognostic significance of bone marrow blast cell terminal transferase in patients with acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 2:667, 1988

22. Claxton DF, Reading CL, Nagarajan L, Tsujimoto Y, Andersson BS, Estey E, Cork A, Huh YO, Trujillo J, Deisseroth AB: Correlation of CD2 expression with PML gene breakpoints in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 80:582, 1992

23. Traweek ST: Immunophenotypic analysis of acute leukemia. *Am.J Clin.Pathol.* 99:504, 1993

24. Orfao A, Chillon MC, Bortoluci AM, Lopez-Berges MC, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, Tabernero MD, Garcia-Marcos MA, Rasillo AI, Hernandez-Rivas J, San Miguel JF: The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-RARalpha gene rearrangements. *Haematologica* 84:405, 1999

25. Kita K, Nakase K, Miwa H, Masuya M, Nishii K, Morita N, Takakura N, Otsuji A, Shirakawa S, Ueda T: Phenotypical characteristics of acute myelocytic leukemia associated with the t(8;21)(q22;q22) chromosomal abnormality: frequent expression of immature B-cell antigen CD19 together with stem cell antigen CD34. *Blood* 80:470, 1992

26. Paietta E, Wiernik PH, Andersen J, Bennett J, Yunis J: Acute myeloid leukemia M4 with inv(16) (p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood* 82:2595, 1993

27. Borowitz MJ, Rubnitz J, Nash M, Pullen DJ, Camitta B: Surface antigen phenotype can predict TEL-AML1 rearrangement in childhood B-precursor ALL: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia* 12:1764, 1998

28. Uckun FM, Gaynon PS, Sensel MG, Nachman J, Trigg ME, Steinherz PG, Hutchinson R, Bostrom BC, Sather HN, Reaman GH: Clinical features and treatment outcome of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia according to the apparent maturational stage of T-lineage leukemic blasts: a Children's Cancer Group study. *J Clin.Oncol.* 15:2214, 1997

29. Pui CH, Carroll AJ, Head D, Raimondi SC, Shuster JJ, Crist WM, Link MP, Borowitz MJ, Behm FG, Land VJ: Near-triploid and near-tetraploid acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood* 76:590, 1990

30. Trueworthy R, Shuster J, Look T, Crist W, Borowitz M, Carroll A, Frankel L, Harris M, Wagner H, Haggard M: Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic

leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin.Oncol.* 10:606, 1992

31. Campana D, Coustan-Smith E: Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 38:139, 1999

32. Campana D, Coustan-Smith E: The use of flow cytometry to detect minimal residual disease in acute leukemia. *Eur.J Histochem.* 40 Suppl 1:39-42:39, 1996

33. Campana D: Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: expectations, possibilities and initial clinical results. *Int.J Clin.Lab.Res.* 24:132, 1994

34. Kallakury BV, Hartmann DP, Cossman J, Gootenberg JE, Bagg A: Posttherapy surveillance of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Value of polymerase chain reaction and limitations of flow cytometry. *Am.J Clin.Pathol.* 111:759, 1999

35. Oelschlagel U, Nowak R, Schaub A, Koppel C, Herbst R, Mohr B, Löffler C, Range U, Gunther H, Assmann M, Siegert E, Wendt E, Huhn R, Brautigam E, Ehninger G: Shift of aberrant antigen expression at relapse or at treatment failure in acute leukemia. *Cytometry* 2000.Aug.15.;42.(4.):247.-53. 42:247,

36. Rothe G, Schmitz G: Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. *Leukemia* 10:877, 1996

37. Hübl, W. Anwendungen der Durchflusszytometrie in der Leukämie und Lymphomdiagnostik. Regensburger Kursskriptum . 2001. (GENERIC)

Ref Type: Electronic Citation

38. Chang CC, Cleveland RP: Decreased CD10-positive mature granulocytes in bone marrow from patients with myelodysplastic syndrome. *Arch.Pathol.Lab.Med.*2000.Aug.;124.(8.):1152.-6. 124:1152,

39. Hübl W, Andert S, Thum G, Ortner S, Bayer PM: Value of neutrophil CD16 expression for detection of left shift and acute-phase response. *Am.J Clin.Pathol.* 187, 1997

40. Eisterer W, Hilbe W, Stauder R, Bechter O, Fend F, Thaler J: An aggressive subtype of B-CLL is characterized by strong CD44 expression and lack of CD11c. *Br.J Haematol.* 93:661, 1996

41. Kipps TJ: Chronic lymphocytic leukemia. *Curr.Opin.Hematol.*2000.Jul.;7.(4.):223.-34. 7:223,

42. D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Dell'Olio M, Di Renzo N, Perla G, Savino L, Carotenuto M: CD38 expression correlates with adverse biological features and predicts poor clinical outcome in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk.Lymphoma.*2001.Jun.;42.(1.-2.):109.-14. 42:109,

43. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, Buccisano F, Epiceno AM, Capelli G, Tamburini A, Suppo G, Battaglia A, Del Principe MI, Del Moro B, Masi M, Amadori S: Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001.Nov.1.;98.(9.):2633.-9. 98:2633,

44. Morabito F, Mangiola M, Oliva B, Stelitano C, Callea V, Deaglio S, Iacopino P, Brugiatielli M, Malavasi F: Peripheral blood CD38 expression predicts survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk.Res.*2001.Nov.;25.(11.):927.-32. 25:927,

45. Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, Lerner S, Kantarjian HM, Albitar M: CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*

2001.Jul.1.;98(1.):181.-6. 98:181,

46. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N.Engl.J Med.*2000.Dec.28.;343.(26.):1910.-6. 343:1910,
47. Su'ut L, O'Connor SJ, Richards SJ, Jones RA, Roberts BE, Davies FE, Fegan CD, Jack AS, Morgan GJ: Trisomy 12 is seen within a specific subtype of B-cell chronic lymphoproliferative disease affecting the peripheral blood/bone marrow and co-segregates with elevated expression of CD11a. *Br.J Haematol.* 101:165, 1998
48. Finn WG, Thangavelu M, Yelavarthi KK, Goolsby CL, Tallman MS, Traynor A, Peterson LC: Karyotype correlates with peripheral blood morphology and immunophenotype in chronic lymphocytic leukemia. *Am.J Clin.Pathol.* 105:458, 1996
49. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, Hamblin T, Lens D, Swansbury GJ, Catovsky D: Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br.J Haematol.* 92:382, 1996
50. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J: Lymphoma classification--from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO classification of lymphoid neoplasms [In Process Citation]. *Ann.Oncol.*2000.;11.Suppl.1.:3.-10. 11 Suppl 1:3-10:3,
51. D'Arena G, Keating MJ, Carotenuto M: Chronic lymphoproliferative disorders: an integrated point of view for the differential diagnosis. *Leuk.Lymphoma.*2000.Jan.;36.(3.-4.):225.-37. 36:225,
52. Cornfield DB, Mitchell DM, Almasri NM, Anderson JB, Ahrens KP, Dooley EO, Braylan RC: Follicular lymphoma can be distinguished from benign follicular hyperplasia by flow cytometry using simultaneous staining of cytoplasmic bcl-2 and cell surface CD20. *Am.J Clin.Pathol.*2000.Aug.;114.(2.):258.-63. 114:258,
53. Lima M, Teixeira MA, Fonseca S, Goncalves C, Guerra M, Queiros ML, Santos AH, Coutinho A, Pinho L, Marques L, Cunha M, Ribeiro P, Xavier L, Vieira H, Pinto P, Justica B: Immunophenotypic aberrations, DNA content, and cell cycle analysis of plasma cells in patients with myeloma and monoclonal gammopathies. *Blood Cells Mol.Dis.*2000.Dec.;26.(6.):634.-45. 26:634,
54. Kyle RA: Multiple Myeloma. Diagnostic challenges and standard therapy. *Semin.Hematol.*2001.Apr.;38.(2.Suppl.3.):11.-4. 38:11,
55. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Blade J, Gonzalez M, Garcia-Sanz R, Lopez-Berges C, Moro MJ, Hernandez J, Escribano L, Caballero D, Rozman M, San Miguel JF: Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am.J Pathol.* 152:1655, 1998
56. Stetler-Stevenson M, Braylan RC: Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders. *Semin.Hematol.*2001.Apr.;38.(2.):111.-23. 38:111,
57. San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, Orfao A : DNA cell content studies in multiple myeloma. *Leuk.Lymphoma.* 23:33, 1996
58. Hanson CA, Schnitzer B: Flow cytometric analysis of cytologic specimens in hematologic disease. *J Clin.Lab.Anal.* 3:2, 1989
59. Simsir A, Fetsch P, Stetler-Stevenson M, Abati A:

Immunophenotypic analysis of non-Hodgkin's lymphomas in cytologic specimens: a correlative study of immunocytochemical and flow cytometric techniques.

Diagn.Cytopathol. 20:278, 1999

60. Zander DS, Iturraspe JA, Everett ET, Massey JK, Braylan RC: Flow cytometry. In vitro assessment of its potential application for diagnosis and classification of lymphoid processes in cytologic preparations from fine-needle aspirates. *Am.J Clin.Pathol.* 101:577, 1994
61. Galindo LM, Garcia FU, Hanau CA, Lessin SR, Jhala N, Bigler RD, Vonderheid EC: Fine-needle aspiration biopsy in the evaluation of lymphadenopathy associated with cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides/Szary syndrome). *Am.J Clin.Pathol.*2000.Jun.;113.(6.):865.-71. 113:865,
62. Zaer FS, Braylan RC, Zander DS, Iturraspe JA, Almasri NM: Multiparametric flow cytometry in the diagnosis and characterization of low-grade pulmonary mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Mod.Pathol.* 11:525, 1998
63. Almasri NM, Zaer FS, Iturraspe JA, Braylan RC: Contribution of flow cytometry to the diagnosis of gastric lymphomas in endoscopic biopsy specimens. *Mod.Pathol.* 10:650, 1997
64. Yao JL, Cangiarella JF, Cohen JM, Chhieng DC: Fine-needle aspiration biopsy of peripheral T-cell lymphomas. A cytologic and immunophenotypic study of 33 cases. *Cancer* 2001.Apr.25.;93.(2.):151.-9. 93:151,
65. Cannon CR, Richardson LD: Value of flow cytometry in the evaluation of head and neck fine-needle lymphoid aspirates: a 3-year retrospective review of a community-based practice. *Otolaryngol.Head.Neck Surg.*2001.May.;124.(5.):544.-8. 124:544,