

Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung in der klinischen Diagnostik

Benjamin Nils Ostendorf, Leo Hansmann, Wolf-Dieter Ludwig, Bernd Dörken, Richard Ratei, Jörg Westermann

Die durchflusszytometrische Immunphänotypisierung ist neben der morphologischen Beurteilung ein Grundpfeiler der hämatologischen Diagnostik. Seit das Verfahren in den 1980er Jahren in die klinische Routinediagnostik eingeführt wurde, hat sich das Indikationsspektrum deutlich erweitert. Der folgende Beitrag gibt eine Übersicht über die häufigsten Indikationen und wichtigsten Limitationen.

Unterschiedliche Streuung | Bei der Durchflusszytometrie (DFZ) passieren Zellen in Suspension Laserlicht, das bei Kontakt mit der analysierten Zelle gestreut wird. Das in Richtung des Laserstrahls orthograd gebrochene Licht („forward scatter“, FSC) lässt auf die Größe der analysierten Zelle schließen. Das seitwärts gebrochene Licht („side scatter“, SSC) korreliert mit der Zellgranularität.

Anhand dieser basalen Streulichteigenschaften können die wichtigsten Zellpopulationen im Blut voneinander unterschieden werden.

Feincharakterisierung | Durch das Laserlicht können zudem verschiedene, an Antikörper gekoppelte Fluorochrome angeregt werden. Diese emittieren daraufhin Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Das emittierte Lichtspektrum wird entsprechend der einzelnen Wellenlängen gefiltert und anschließend detektiert, sodass mehrere membranäre und zytoplasmatische Antigene einer Zelle synchron untersucht werden können. Dies ermöglicht es, einzelne Zellen und Zellpopulationen detailliert zu charakterisieren (► **Abb. 1**). Die Methode wird daher als Immunphänotypisierung bezeichnet. In ► **Tab. 1** sind exemplarisch einzelne Antigene aufgelistet, die wichtig sind, um die verschiedenen Zellpopulationen einer Linie zuzuordnen.

Pathologische Merkmale | Mehrere immunphänotypische Merkmale charakterisieren pathologische Zellpopulationen, z. B.

- ▶ krankhafte Zunahme, Verminderung oder Fehlen von üblicherweise vorhandenen Zellpopulationen,
- ▶ verstärkte/verminderte Expression bzw. Verlust eines spezifischen, an sich physiologischen Antigens und
- ▶ Expression aberranter Antigene (► **Tab. 2**).

Bei der Bewertung von Zellpopulationen ist die relative Verteilung und ihre absolute Häufigkeit pro Mikroliter Blut zu berücksichtigen.

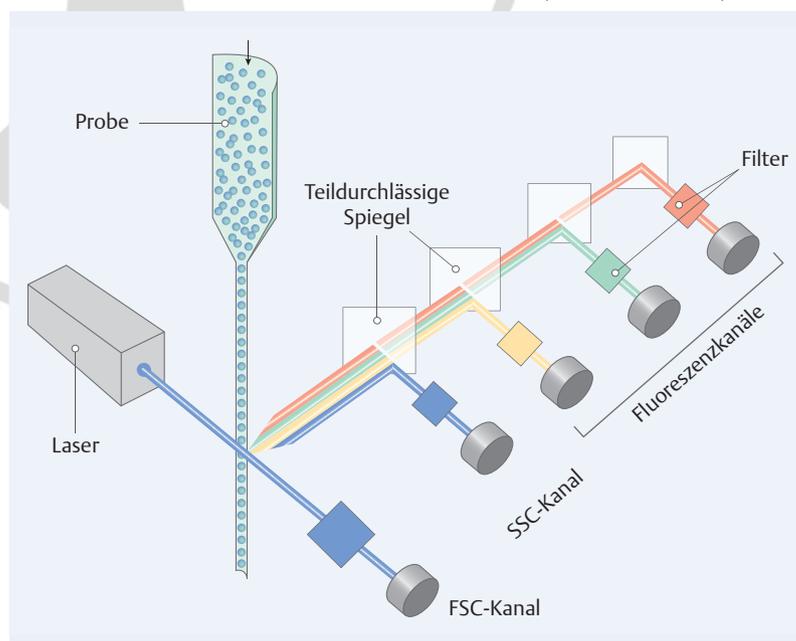
Vorteile | Mit der DFZ können große Zellzahlen schnell auf Einzelzellniveau analysiert und somit auch kleine Zellpopulationen identifiziert werden. Untersucht werden können

- ▶ peripheres Blut,
- ▶ Knochenmark,
- ▶ Pleura- und Perikardergüsse,
- ▶ Aszites,
- ▶ Zellsuspensionen aus Lymphknotengewebe,
- ▶ bronchoalveoläres Lavageaspirat sowie
- ▶ Liquor.

Indikationen | Eine Übersicht zur Indikationsstellung der diagnostischen Immunphänotypisierung in verschiedenen klinischen Situationen gibt ► **Abb. 2**. Neben charakteristischen Veränderungen des Blutbilds können auch klinische Befunde eine Indikation zur durchflusszytometrischen Diagnostik darstellen. Im Einzelfall müssen bei der Indikationsstellung weitere Faktoren mit einbezogen werden, wie

- ▶ Anamnese,
- ▶ zusätzliche Laborwerte und
- ▶ apparative Befunde.

Abb. 1 Prinzip der Durchflusszytometrie. FSC = „forward scatter“ (Vorwärtsstreuung), SSC = „side scatter“, (Seitwärtsstreuung).



Zelllinie	Antigene
Progenitorzellen	CD34, CD117, CD133, TdT (intrazellulär)
myeloisch	MPO (intrazellulär), CD13, CD33
B-lymphatisch	CD19, CD20, CD22, CD79a, CD22 (intrazellulär), CD79a (intrazellulär)
T-lymphatisch	CD3, CD3 (intrazellulär)

Tab. 1 Linienzugehörigkeit exemplarischer Antigene (CD = „cluster of differentiation“, MPO = Myeloperoxidase, TdT = terminale Desoxyribonukleotidyl-Transferase).

Akute Leukämien

Unreife Zellklone | Akute Leukämien zeichnen sich dadurch aus, dass ein unreifer „blastärer“ Zellklon im Knochenmark expandiert. I.d.R. erfolgt die endgültige Diagnostik einer akuten Leukämie aus dem Knochenmark. In vielen Fällen kann die Diagnose jedoch bereits anhand von peripheren Blutproben gestellt werden.

Die DFZ ist ein integraler Bestandteil der Leukämiediagnostik. Häufig ergeben sich bereits aus den basalen Streulichtheigenschaften Hinweise auf eine pathologische Blastenpopulation.

Kein universeller Marker | Für die Routinediagnostik gibt es keinen einzelnen Marker, der spezifisch für Leukämiezellen ist. Vielmehr sind die beschriebenen komplexen Merkmale pathologischer Zellen entscheidend für die Diagnose. Ein im individuellen Fall nachgewiesenes pathologisches Markerprofil wird dabei als „Leukämie-assoziiertes Immunphänotyp“ bezeichnet.

Rasche Charakterisierung möglich | Von großer Bedeutung ist, dass die Linienzugehörigkeit einer Leukämie mittels Immunphänotypisierung innerhalb kurzer Zeit ermittelt werden kann (► **Tab. 1**). In Zusammenschau mit der Morphologie ermöglicht dies eine gezielte zyto- und molekulargenetische Diagnostik sowie eine zügige spezifische medikamentöse Therapie.

Nicht immer eindeutig | Ein Sonderfall sind seltene akuten Leukämien, die durchflusszytometrisch keiner Linie zuzuordnen sind („acute leukemia of ambiguous lineage“, ALAL). Dabei handelt es sich entweder um akute undifferenzierte Leukämien (AUL) ohne eindeutige Linienzugehörigkeit oder akute Leukämien, bei denen sowohl myeloische als auch lymphatische Antigene nachweisbar sind („mixed phenotype acute leukemia“, MPAL) [1].

Die Immunphänotypisierung ist Bestandteil der OPS 1–941.0. Sie kann bei akuten Leukämien im Rahmen der komplexen hämatologischen Diagnostik abgerechnet werden.

Akute Myeloische Leukämie (AML)

DFZ sichert Diagnose | Bei der Diagnostik der AML hat die DFZ im Wesentlichen eine bestätigende Rolle. Die myeloische Linienzugehörigkeit kann in vielen Fällen bereits zytologisch bzw. zytochemisch nachgewiesen werden (Myeloperoxidase- bzw. Esteraseaktivität).

Entscheidend bei bestimmten Formen | Die DFZ ist bei bestimmten Unterformen der AML allerdings entscheidend, z. B. der

- ▶ AML mit minimaler Differenzierung (ehemals FAB-M0; FAB: „French-British-American classification“),
- ▶ Megakaryoblastenleukämie (FAB-M7),
- ▶ akuten Promyelozytenleukämie, und eingeschränkt
- ▶ der Erythroleukämie (FAB-M6).

Insbesondere die akute Promyelozytenleukämie ist eine klinisch wichtige Entität, die eine spezifische Therapie u. a. mit All-Trans-Retinsäure erfordert. Immunphänotypisch unterstützt hier die oftmals fehlende Expression von CD34 (CD: „cluster of differentiation“) und HLA-DR („human leukocyte antigen-D related“) bei stark exprimierter Myeloperoxidase die zytomorphologische Diagnose [2].

Die aktuelle WHO-Klassifikation der AML richtet sich vorrangig nach zyto- und molekulargenetischen und weniger nach immunphänotypisch nachweisbaren Aberrationen [1]. Manche Immunphänotypen weisen jedoch auf genetische Aberrationen hin [3].

Akute Lymphatische Leukämie (ALL)

DFZ essenziell | Im Gegensatz zur AML ist die Immunphänotypisierung bei der ALL von großer Bedeutung, um die Erkrankung zu klassifizieren. Sie liegt der immunphänotypischen Klassifikation der „European Group for the Immunophenotyping of Leukemias“ (EGIL) zugrunde. Neben der Zuordnung zur B- bzw. T-Zellreihe wird dabei auch das Reifungsstadium der Blasten einbezogen [4]. Diese Einteilung hat sowohl prognostische als auch therapeutische Konsequenzen und verdeutlicht den zentralen Stellenwert der DFZ bei der ALL-Diagnostik.

Die DFZ ist nicht nur in der Initialdiagnostik wichtig, sondern auch im Rahmen der Verlaufsbeobachtung von akuten Leukämien.

Minimale Resterkrankung | Aufgrund der aberranten Expressionsmuster leukämischer Blasten können residuale leukämische Zellpopulationen bis zu einer Sensitivität von 10^{-4} – 10^{-5} als minimale Resterkrankung (MRD: „minimal residual

disease“) identifiziert und quantifiziert werden [5–7]. Der durchflusszytometrische MRD-Nachweis ist mit den molekulargenetischen Methoden der MRD-Diagnostik nicht einfach zu vergleichen. Stattdessen sollten sich die beiden Methoden ergänzen und die Befunde zusammen mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung interpretiert werden. Prinzipiell erreichen aber moderne, PCR-basierte Verfahren eine 10-fach höhere Sensitivität als die DFZ [8].

Myelodysplastisches Syndrom (MDS)

Verschiedene Erkrankungen | Das MDS umfasst eine heterogene Gruppe von klonalen Stammzellerkrankungen. Sie werden charakterisiert durch eine periphere Zytopenie sowie eine dysplastische und ineffiziente Hämatopoese im Knochenmark.

DFZ gewinnt an Bedeutung | Die Diagnose MDS wurde lange vornehmlich mithilfe von zytomorphologischen, histologischen und zytogenetischen Verfahren gestellt. Die DFZ wurde dagegen hauptsächlich eingesetzt, um die Blastenpopulation zu quantifizieren. Zunehmend werden jedoch auch andere MDS-assoziierte durchflusszytometrische Merkmale in der klinischen Routinediagnostik berücksichtigt [9–11], z. B.

- ▶ CD45-Expressionsstärke,
- ▶ Streulichteigenschaften,
- ▶ Verhältnis von myeloischen zu B-lymphatischen Progenitorzellen und
- ▶ aberrante Markerexpression.

Myeloproliferative Neoplasien

Wichtig in der Spätphase | Bei myeloproliferativen Neoplasien (MPN) spielen neben noch selteneren Krankheiten folgende Erkrankungen die größte Rolle in der hämatologischen Routinediagnostik:

- ▶ chronische myeloische Leukämie (CML),
- ▶ essenzielle Thrombozythämie (ET),
- ▶ Polycythaemia vera (PV) und
- ▶ primäre Myelofibrose (PMF).

Blastenkrisen | Der Stellenwert der DFZ liegt bei MPN praktisch ausschließlich bei der Diagnose (und Typisierung, d. h. myeloisch versus lymphatisch) von Blastenkrisen infolge der Transformation einer MPN in eine akute Leukämie. In der frühen Phase dieser Erkrankungen spielt die DFZ i. d. R. keine Rolle.

Sehr nützlich ist die DFZ in der Diagnostik von systemischen Mastzellerkrankungen, da maligne Mastzellen einen aberranten Phänotyp mit Koexpression von CD2, CD25 und CD117 aufweisen [12, 13].

B-Zell Lymphome

Nicht immer im Blut | Die DFZ ist auch in der Diagnostik maligner Lymphome fest etabliert. Zu bedenken ist, dass Lymphomzellen nur in manchen Fällen in das periphere Blut ausgeschwemmt werden bzw. das Knochenmark infiltrieren. Lymphome anhand von Zellsuspensionen aus Lymphknotengewebe nachzuweisen ist prinzipiell möglich, in der Praxis jedoch wenig verbreitet [14].

Nachweis durch Leichtkettenrestriktion | B-Zell-Neoplasien sind wesentlich häufiger als T-Zell-Neoplasien. Die für Neoplasien charakteristische Monoklonalität kann bei B-Zell-Lymphomen immunphänotypisch durch eine Leichtkettenrestriktion meist eindeutig nachgewiesen werden [15]. Die monoklonale B-Zell-Population wird dabei anhand eines veränderten Verhältnisses von κ - zu λ -Leichtketten angezeigt.

Je nach Markerprofil gibt die Immunphänotypisierung Hinweise auf die Lymphomentität.

Chronische lymphatische Leukämie | Ein wichtiges Beispiel ist das charakteristische Markerprofil der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) mit Expression von CD5 und CD23, (partiell) Verlust reifer B-Zellmarker wie CD20 und CD22 und schwacher Oberflächen-Immunglobulinexpression. Folgerichtig eignet sich die DFZ hier auch sehr gut dazu, die MRD zu bestimmen [16].

Blutprobe reicht bei CLL aus | Eine CLL kann in den meisten Fällen anhand des peripheren Bluts diagnostiziert werden. Immunphänotypische Marker wie CD38 und ZAP70 haben in frühen Krankheitsstadien darüber hinaus eine prognostische Bedeutung [17, 18]. Von der CLL abzugrenzen ist die monoklonale Lymphozytose unklarer Signifikanz (MLUS). Dabei liegen weni-

Tab. 2 Immunphänotypische Charakteristika pathologischer Zellpopulationen.

Immunphänotyp	Klinisches Beispiel
pathologische Zunahme von Subpopulationen	verschobenes Verhältnis der κ/λ -Leichtkettenexpression bei reifen B-Zell-Lymphomen
fehlende Markerexpression	Verlust des T-Zellmarkers CD3 bei vielen T-Zell-Neoplasien
aberrante Markerexpression	Expression des B-Zellmarkers CD19 auf myeloischen Zellen
asynchrone Markerexpression	gleichzeitige Expression des Progenitor-markers CD34 und des Reifemarkers CD20 bei manchen ALL-Formen
quantitativ veränderte Markerexpression	überhöhte Expression von CD33 bei manchen AML-Formen
ALL = Akute Lymphatische Leukämie, AML = Akute Myeloische Leukämie, CD = „cluster of differentiation“	

ger als 5000 monoklonale Lymphozyten/ μl vor, bei fehlender Lymphadenopathie und Organomegalie [19].

Plasmazellneoplasien | Zum typischen Immunphänotyp von Plasmazellneoplasien gehören

- ▶ Expression von CD38 und CD138,
- ▶ erniedrigte Expression von CD45 und
- ▶ aberrante Expression von CD56.

Die Leichtketten (κ/λ) der Immunglobuline werden meist nur zytoplasmatisch exprimiert. Eine Leichtkettenrestriktion kann so nachgewiesen werden.

Reaktive und neoplastische Plasmazellpopulationen können mithilfe der Durchflusszytometrie sehr gut unterschieden werden [20].

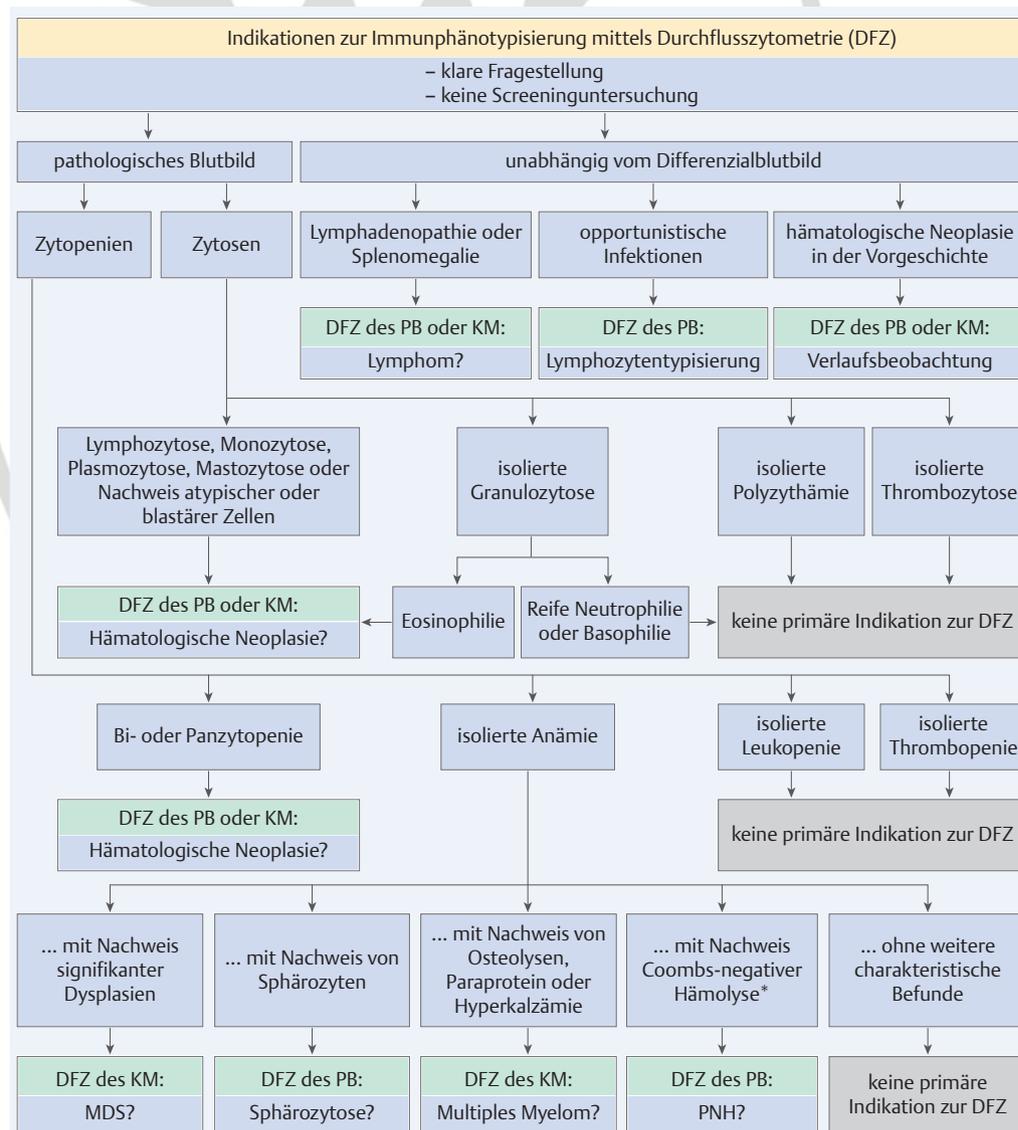
Um die Myelomzellpopulation exakt zu quantifizieren, sind jedoch andere (morphologische) Methoden zu bevorzugen. Bei der DFZ tritt dabei methodisch bedingt ein ausgeprägter „sampling error“ auf [20].

Sonderfall Hodgkin-Lymphom | Eine Ausnahme bei der Immunphänotypisierung von B-Zell-Lymphomen ist das Hodgkin-Lymphom, da das Tumorgewebe hauptsächlich aus reaktiven, nicht-neoplastischen Zellen besteht. Deshalb wird die DFZ hier nicht routinemäßig eingesetzt.

T-Zell Lymphome

Klonalitätsbestimmung anspruchsvoll | Die immunphänotypische Diagnostik von T-Zell-Lymphomen ist anspruchsvoll. Die Klonalitätsbestimmung ist deutlich aufwändiger und liefert nicht immer eindeutige Ergebnisse. Deshalb sind hier die besprochenen Charakteristika pathologischer Zellen besonders wichtig, z. B.

- ▶ verschobenes Verhältnis von CD4-exprimierenden T-Helfer- zu CD8-positiven T-Zellen,
- ▶ (partieller) Verlust von T-Zellmarkern bzw. CD45,
- ▶ veränderte Streulichteigenschaften oder
- ▶ aberrante Markerexpression.



T-Zell-Rezeptoren | Bei der immunphänotypischen Diagnostik von T-Zellneoplasien kann die Abgrenzung zu einer reaktiven Zellpopulation mitunter sehr schwierig sein [21]. In Zweifelsfällen kann eine molekulare oder auch die durchflusszytometrische Analyse der verschiedenen T-Zell-Rezeptoren (α - β / γ - δ) Aufschluss über eine vermutete Monoklonalität geben [22, 23].

Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH)

Charakteristische Trias | Die PNH ist eine seltene erworbene Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen. Sie ist häufig durch folgende klinische Trias gekennzeichnet: periphere Zytopenie, Hämolyse und venöse Thrombosen.

Diagnostik | Pathogenetisch sind bei der PNH bestimmte Oberflächenmarker auf dem betroffenen Zellklon genetisch bedingt vermindert, die normalerweise durch Glycerin-Phosphatidylinositol (GPI) in der Membran verankert sind. Bei der Diagnostik sollten unbedingt mehrere GPI-verankerte Moleküle auf mehreren Zellreihen untersucht werden, z. B. Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Retikulozyten. Als Diagnosekriterium gilt die verminderte Expression von mindestens zwei GPI-verankerten Markern auf mindestens zwei Zellreihen [24].

Die DFZ ist bei PNH der diagnostische Goldstandard, da sie eine PNH-Population eindeutig identifizieren und quantifizieren kann [25].

Bei Patienten mit MDS oder aplastischer Anämie liegt nicht selten auch ein kleiner PNH-Klon vor. Dies stellt die eigentliche Grunderkrankung bei ansonsten passenden Befunden jedoch nicht prinzipiell infrage.

Hereditäre Anämien

Membranproteine betroffen | Bei einer Reihe von hereditären hämolytischen Anämien sind erythrozytäre Membranproteine genetisch bedingt verändert. Die häufigste hereditäre Membranopathie in Nordeuropa ist die hereditäre Sphärozytose. Bei der Diagnostik spielt die DFZ eine wichtige Rolle: Bei betroffenen Patienten wird immunphänotypisch eine verminderte Bindung des fluoreszierenden Farbstoffes Eosin-5-Maleimid an verschiedene Membranproteine mit einer Sensitivität von ca. 93% und Spezifität von ca. 99% nachgewiesen (EMA-Test) [26].

Die Ergebnisse müssen in Zusammenschau mit der Klinik und dem peripheren Blutaussstrich interpretiert werden.

DFZ in der Immundiagnostik

Etabliert in HIV-Diagnostik | Die DFZ wurde erstmals routinemäßig eingesetzt, um die CD4-positiven T-Helferzellen bei Patienten mit HIV-Infektion zu bestimmen. Nach wie vor dient dies dazu, die Stadien einzuteilen und das Therapieansprechen zu beurteilen [27].

Standard der Lymphozytentypisierung | Auch bei Patienten mit anderen erworbenen oder hereditären Immundefekten wird die DFZ diagnostisch angewendet [28, 29], insbesondere zur Lymphozytentypisierung. Dabei werden folgende Zellpopulationen differenziert und quantifiziert:

- ▶ CD4+-T-Helferzellen,
- ▶ zytotoxische CD8+ T-Zellen,
- ▶ regulatorische T-Zellen,
- ▶ B-Zellen,
- ▶ natürliche Killerzellen (NK-Zellen),
- ▶ NK-T-Zellen sowie ggf. auch
- ▶ aktivierte Subpopulationen.

Weitere Anwendungen

Thrombozytendiagnostik | Die DFZ wird auch im Rahmen der Thrombozytendiagnostik eingesetzt: Anhand eines Verlusts spezifischer Antigene lassen sich hereditäre Thrombozytopathien diagnostizieren, wie das Bernard-Soulier-Syndrom oder die Glanzmann-Thrombasthenie. Zudem können Thrombozytenfunktionsstörungen nachgewiesen werden, die mit verschiedenen klinischen Syndromen und Medikamenten assoziiert sind [30].

Seltene Fragestellungen | Die DFZ wird auch bei anderen, selteneren Fragestellungen eingesetzt. Hierzu zählt die Gewinnung von Blutstammzellprodukten (Zählung CD34-positiver Stammzellen) sowie die Diagnostik von hereditären Granulozytendefekten [31, 32].

Limitationen und Perspektiven

Spezifische Fragestellung | Neben technischen Besonderheiten, wie Auswahl richtiger Kontrollen, spektralen Überlagerungserscheinungen und Gatingstrategien gibt es auch aus klinischer Sicht mehrere Limitationen der Immunphänotypisierung zu bedenken. Von größter Bedeutung ist eine spezifische Fragestellung, da es sich bei der DFZ nicht um ein Screeningverfahren, sondern um eine confirmatorische Methode handelt. Je nach Fragestellung werden sehr unterschiedliche Antikörperpanels verwendet.

Rasche Analyse | Aus präanalytischer Sicht ist es wichtig, die Proben zügig zu transportieren (Analyse innerhalb von 48 Stunden). Zu alte Proben können zu Messfehlern führen [33]. Sind längere Lagerungszeiten unvermeidbar (z. B. für Studien-



Dr. med. Benjamin Nils Ostendorf

war wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie der Charité – Campus Virchow Klinikum in Berlin und ist aktuell Postdoctoral Fellow an der Rockefeller University in New York.
benjamin.ostendorf@charite.de



Dr. med. Leo Hansmann

ist wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie der Charité – Campus Virchow Klinikum und Clinical Scientist am Berlin Institute of Health.
leo.hansmann@charite.de



Prof. Dr. med. Wolf-Dieter Ludwig

ist Chefarzt der Klinik für Hämatologie, Onkologie, Tumorimmunologie und Palliativmedizin im Helios Klinikum in Berlin-Buch.
wolf-dieter.ludwig@helios-kliniken.de



Prof. Dr. med. Bernd Dörken ist Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin und Direktor des Fachbereichs Hämatologie / Onkologie im Labor Berlin. bernd.doerken@charite.de



PD Dr. med. Richard Ratei ist Chefarzt der 2. Medizinischen Klinik des Carl-Thiem-Klinikums in Cottbus und leitete das Referenzlabor Immunphänotypisierung der ALL-BFM Studie. 2.med.klinik@ctk.de



Prof. Dr. med. Jörg Westermann ist stellvertretender Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie der Charité – Campus Virchow Klinikum in Berlin und Laborleiter im Fachbereich Hämatologie / Onkologie im Labor Berlin. joerg.westermann@charite.de

Interessenkonflikt

Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

DOI 10.1055/s-0042-109432
Dtsch Med Wochenschr
2016; 141: 1569–1574
© Georg Thieme Verlag KG ·
Stuttgart · New York ·
ISSN 0012-0472

zwecke), bietet es sich an, spezielle Röhrchen einzusetzen, die eine längere Zellstabilität mit Erhalt der Oberflächenantigene gewährleisten [34]. Als Antikoagulanzen werden bei der DFZ Heparin und EDTA eingesetzt, wobei heparinisierte Proben in der Regel stabiler sind [33].

Probenmaterial | Untersuchungsmaterialien wie Aszites, Pleura-/Perikardergüsse oder Liquor sind oft zellarm und können größere Materialmengen oder eine Zellanreicherung erfordern. Zellen sind in diesen Medien instabiler als im Blut, die Wahrscheinlichkeit von Artefakten ist daher erhöht.

Bei Liquorproben empfiehlt es sich, aufgrund der ausgeprägten Instabilität der Zellen spezielle Transportbehälter zu nutzen [35, 36].

Befunde integrieren | Es ist von großer Bedeutung, die Ergebnisse der DFZ vor dem Hintergrund des patientenspezifischen klinischen Kontexts zu interpretieren und zusammen mit den Befunden der Morphologie (Zytologie, Histologie), Zyto- und Molekulargenetik zu beurteilen. Dies erfordert eine gute Kommunikation zwischen Klinikern, Zytomorphologen und Pathologen. Beispielhaft können bei der AML monozytär differenzierte Blasten ohne exprimierte Progenitormarker auftreten. Diese sind immunphänotypisch ohne ergänzenden morphologischen Befund häufig nicht eindeutig als Blasten identifizierbar. Umgekehrt kann eine kleine aberrante Population immunphänotypisch häufig klassifiziert werden, ohne morphologisch sicher abgrenzbar zu sein.

Enorme Entwicklung | Seit den 1960er Jahren hat sich die DFZ rasant entwickelt, vor allem hin-

sichtlich Zytometertechnik, neuer Fluorochrome sowie der Datenanalyse. Hierdurch hat sich sowohl die Messgeschwindigkeit als auch die Anzahl der gleichzeitig erfassbaren Parameter deutlich gesteigert [37, 38].

Perspektiven | Ergänzt werden die Entwicklungen der DFZ durch innovative Technologien wie die Massenzytometrie („Cytometry by time-of-flight“) [39]. Ihr Einsatz wird zwar vorerst wissenschaftlichen Anwendungen vorbehalten bleiben, allerdings können die hochdimensionalen Datensätze in translationalen Ansätzen genutzt werden. Die Identifikation neuer Zellpopulationen kann zur Modifikation etablierter Panels und der Erweiterung der Indikationen zur DFZ führen [40].

Konsequenz für Klinik und Praxis

- ▶ Die Immunphänotypisierung ist ein unverzichtbarer Bestandteil der spezifischen hämatologischen Labordiagnostik.
- ▶ Das Indikationsspektrum umfasst Lymphozytentypisierung, hämatologische Neoplasien, paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie, Thrombozytopathien und bestimmte hereditäre Anämien (Sphärozytose).
- ▶ Eine spezifische Fragestellung und die Interpretation der Ergebnisse im klinischen Kontext sind unabdingbar.
- ▶ Um die klinische Aussagekraft zu erhöhen und irreführende Ergebnisse zu vermeiden, müssen die Ergebnisse anderer Untersuchungsmethoden einbezogen werden – insbesondere der Morphologie, Zyto- und Molekulargenetik.
- ▶ Proben für die Immunphänotypisierung sollten innerhalb von 48 Stunden analysiert werden.

Literatur

- 1 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4. Aufl. World Health Organization: Genf; 2008
- 2 San Miguel JF, Gonzalez M, Cañizo MC et al. Surface marker analysis in acute myeloid leukaemia and correlation with FAB classification. 1986; 64: 547–560
- 3 Wuchter C, Harbott J, Schoch C et al. Detection of acute leukemia cells with mixed lineage leukemia (MLL) gene rearrangements by flow cytometry using monoclonal antibody. Leukemia 2000; 14: 1232–1238
- 4 Béné MC, Castoldi G, Knapp W et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia 1995; 9: 1783–1786
- 5 Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. J Clin Oncol 2009; 27: 5168–5174
- 6 Campana D. Should minimal residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia be standard of care? Curr Hematol Malig Rep 2012; 7: 170–177
- 7 Kern W, Bacher U, Haferlach C et al. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML. Best Pract Res Clin Haematol 2010; 23: 379–390
- 8 Gaipa G, Cazzaniga G, Valsecchi MG et al. Time point-dependent concordance of flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 2012; 97: 1582–1593
- 9 Kern W, Bacher U, Haferlach C et al. Multiparameter flow cytometry provides independent prognostic information in patients with suspected myelodysplastic syndromes: A study on 804 patients. Cytometry B Clin Cytom 2015; 88: 154–164
- 10 Porta Della MG, Picone C, Pascutto C et al. Multicenter validation of a reproducible flow cytometric score for the diagnosis of low-grade myelodysplastic syndromes: results of a European LeukemiaNET study. Haematologica 2012; 97: 1209–1217

Vollständiges Literaturverzeichnis unter <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-109432>

- 11 Westers TM, Ireland R, Kern W et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* 2012; 26: 1730–1741
- 12 Escribano L, Díaz-Agustín B, Bellas C et al. Utility of flow cytometric analysis of mast cells in the diagnosis and classification of adult mastocytosis. *Leukemia Res* 2001; 25: 563–570
- 13 Pozdnyakova O, Kondratiev S, Li B et al. High-sensitivity flow cytometric analysis for the evaluation of systemic mastocytosis including the identification of a new flow cytometric criterion for bone marrow involvement. *Am J Clin Pathol* 2012; 138: 416–424
- 14 Colorado M, Cuadrado MA, Insunza A et al. Simultaneous cytomorphologic and multiparametric flow cytometric analysis on lymph node samples is faster than and as valid as histopathologic study to diagnose most Non-Hodgkin Lymphomas. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 83–91
- 15 Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111: 3941–3967
- 16 Böttcher S, Ritgen M, Kneba M. Flow cytometric MRD detection in selected mature B-cell malignancies. *Methods Mol Biol* 2013; 97: 149–174
- 17 Crespo M, Bosch F, Villamor N et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 1764–1775
- 18 Damle RN, Wasil T, Fais F et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840–1847
- 19 Hallek M, Cheson BD, Catovsky D et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111: 5446–5456
- 20 Rawstron AC, Orfao A, Beksac M et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008; 93: 431–438
- 21 Weisberger J, Cornfield D, Gorczyca W et al. Down-regulation of pan-T-cell antigens, particularly CD7, in acute infectious mononucleosis. *American Journal of Clinical Pathology* 2003; 120: 49–55
- 22 Beck RC, Stahl S, O’Keefe CL et al. Detection of mature T-Cell leukemias by flow cytometry using anti-T-cell receptor V β antibodies. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 785–794
- 23 Langerak AW, Szczepański T, van der Burg M et al. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. 1997; 11: 2192–2199
- 24 Parker C. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106: 3699–3709
- 25 Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2012; 82: 195–208
- 26 King MJ, Smythe JS, Mushens R. Eosin-5-maleimide binding to band 3 and Rh-related proteins forms the basis of a screening test for hereditary spherocytosis. *Br J Haematol* 2004; 124: 106–113
- 27 Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet* 2014; 384: 258–271
- 28 de Vries E, Noordzij JG, Kuijpers TW et al. Flow cytometric immunophenotyping in the diagnosis and follow-up of immunodeficient children. *Eur J Pediatr* 2001; 160: 583–591
- 29 Oliveira JB, Notarangelo LD, Fleisher TA. Applications of flow cytometry for the study of primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8: 499–509
- 30 Linden MD, Frelinger AL, Barnard MR et al. Application of flow cytometry to platelet disorders. *Semin. Thromb Hemost* 2004; 30: 501–511
- 31 Carulli G. Applications of flow cytometry in the study of human neutrophil biology and pathology. *Hematopathol Mol Hematol* 1996; 10: 39–61
- 32 Gratama JW, Sutherland DR, Keeney M. Flow cytometric enumeration and immunophenotyping of hematopoietic stem and progenitor cells. *Semin Hematol* 2001; 38: 139–147
- 33 Davis BH, Dasgupta A, Kussick S et al. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS – part II – preanalytical issues. *Cytometry B Clin Cytom* 2013; 84: 286–290
- 34 Ng AAP, Lee BTK, Teo TSY et al. Optimal cellular preservation for high dimensional flow cytometric analysis of multicentre trials. *J Immunol Meth* 2012; 385: 79–89
- 35 Dux R, Kindler-Röhrborn A, Annas M et al. A standardized protocol for flow cytometric analysis of cells isolated from cerebrospinal fluid. *J Neurol Sci* 1994; 121: 74–78
- 36 Jongste AH, Kraan J, van den Broek PD et al. Use of TransFix™ cerebrospinal fluid storage tubes prevents cellular loss and enhances flow cytometric detection of malignant hematological cells after 18 hours of storage. *Cytometry B Clin Cytom* 2014; 86: 272–279
- 37 Chattopadhyay PK, Roederer M. A mine is a terrible thing to waste: high content, single cell technologies for comprehensive immune analysis. *Am J Transplant* 2015; 15: 1155–1161
- 38 Kling J. Cytometry: Measure for measure. *Nature* 2015; 518: 439–443
- 39 Spitzer MH, Gherardini PF, Fragiadakis GK et al. IMMUNOLOGY. An interactive reference framework for modeling a dynamic immune system. *Science* 2015; 349: 1259425–1259425
- 40 Hansmann L, Blum L, Ju CH et al. Mass cytometry analysis shows that a novel memory phenotype B cell is expanded in multiple myeloma. *Cancer Immunol Res* 2015; 3: 650–660