

Update der Lymphozyten- differenzierung – Hilfreich oder verzichtbar?

Xtra Vol. 16.2 | 2012 | Nr. 01

Die Differenzierung der Lymphozyten im Blutausschlag stellt aufgrund der Bandbreite der Erscheinungsformen und der Vielzahl der Erkrankungen eine der größten Herausforderungen der Zytologie überhaupt dar. Grundvoraussetzung für die Erstellung qualifizierter zytologischer Blutbefunde, besonders solcher mit Lymphozytenveränderungen, ist, neben der Erfahrung des Untersuchers, die Verfügbarkeit einer standardisierten Nomenklatur. Zum Zweck der einheitlichen Differenzierung der Lymphozyten innerhalb Deutschlands und der Angleichung an den europäischen Konsens hat der Arbeitskreis Labor der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) die überarbeitete Lymphozyteneinteilung 2011 als Empfehlung veröffentlicht [3].

Die wesentlichen Ergebnisse und Veränderungen, die sich aus diesem Update ergeben, sollen im Folgenden komprimiert dargestellt werden. Ziel ist dabei, diese möglichst vielen zytologisch tätigen MTA und Laborkräften zugänglich und verständlich zu machen. Darüber hinaus kann hier bereits auf Erfahrungen in der Anwendung zurückgegriffen und somit ein erstes Resümee gezogen werden.

Grundlagen

Entwicklung der Lymphozyten

Die Lymphozyten lassen sich bekanntlich unterteilen in B-, T- und NK-Zellen (natürliche Killerzellen) [4, 6]. Ausgangszelle ist die lymphatische Stammzelle, aus der sich alle folgenden Entwicklungsstufen ableiten. Die Prägung der Lymphozyten findet in den primären lymphatischen Organen (T-Zellen = Thymus, B-Zellen = Knochenmark) statt [1, 5]. Durch Antigenkontakt entstehen in den sekundären lymphatischen Geweben (Lymphknoten, Milz u. a.) sogenannte Effektorzellen, die die adaptierte Immunität sicherstellen und durch spezifische Antigen-Expressionsmuster immunphänotypisch identifizierbar sind (Abb.1).

In der B-Zellreihe ist die Plasmazelle der differenzierteste Vertreter, und zugleich ist sie die einzige nicht teilungsfähige Zelle im gesamten lymphatischen System [7]. Indem sie Immunglobulin bilden, sind die Plasmazellen die Träger der humoralen Immunität. Die peripheren T-Zellen exprimieren neben dem T-Zellrezeptor und den Pan-T-Zellmarkern zusätzlich entweder CD4 oder CD8 [13, 15].

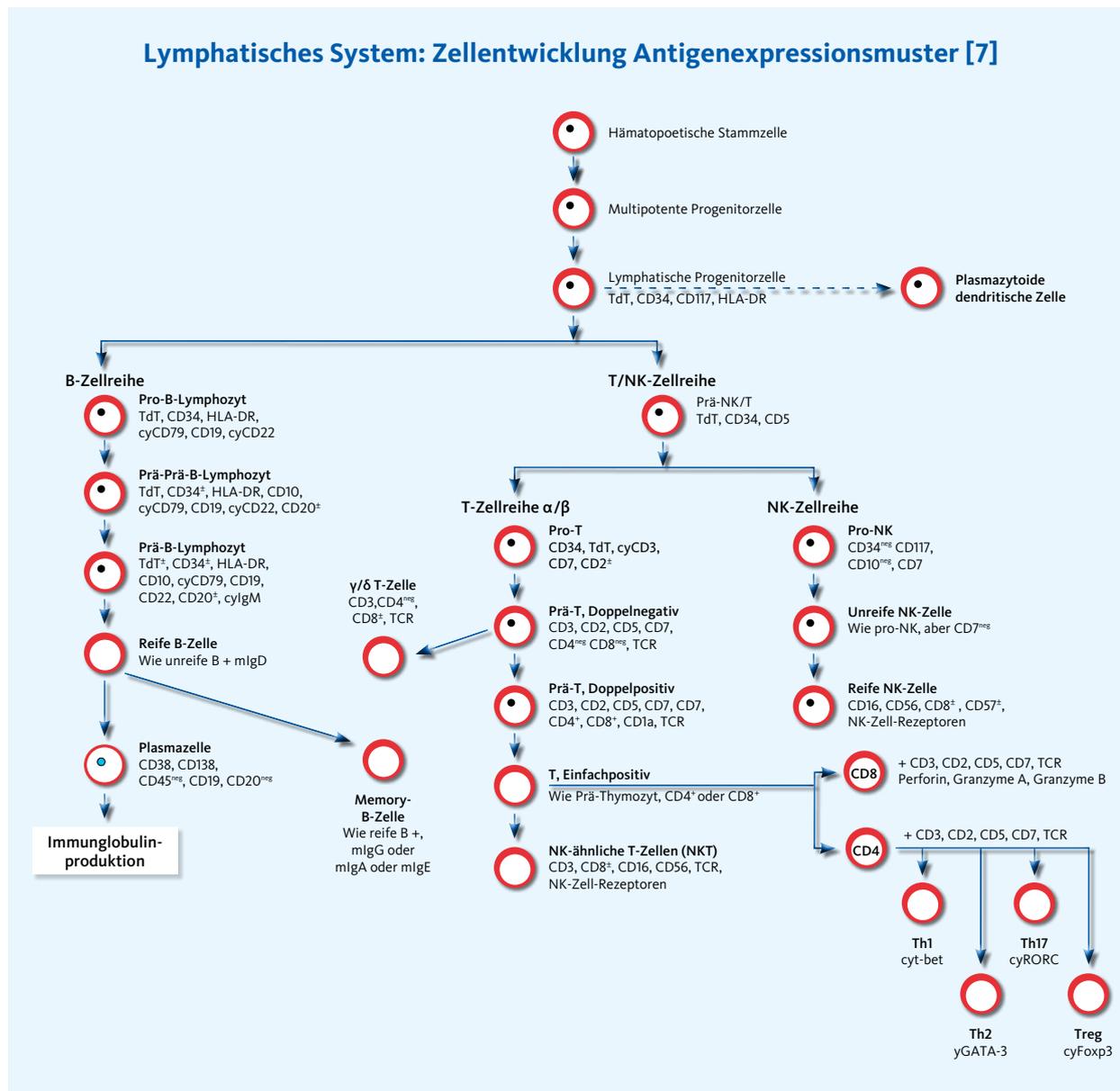


Abb. 1 Zytologisch erscheinen die unreifen Zellen als Blasten. Die reifen, hier ohne Nukleolus dargestellten Zellen, sind lymphatische »Zyten« mit variabler Morphologie. Ihre Differenzierung ist mit der panoptischen Färbung oft unzuverlässig. Zur sicheren Beurteilung ist eine immunzytologische Untersuchung erforderlich. NK-Zellen sind azurophil granuliert (large granular lymphocytes).

Typische Lymphozyten im Blutausstrich

Im Blut von gesunden Erwachsenen kommen ca. 1000–2800 Lymphozyten/ μ L vor [8]. Es handelt sich zu 55–83% um naive T-Lymphozyten, zu 6–19% um naive B-Lymphozyten sowie zu 7–31% um NK-Zellen [8]. Naiv bedeutet in diesem Zusammenhang, dass noch kein Antigenkontakt stattgefunden hat.

Im Pappenheim gefärbten Blutausstrich, also zytomorphologisch, werden diese normalen Lymphozyten als typische Lymphozyten zusammengefasst. Dabei sind die naiven T- und B-Lymphozyten morphologisch meist nicht zu unterscheiden und stellen sich als Standardlymphozyten mit den folgenden Merkmalen dar:

- Größe etwa 8–10 µm
- Kerndurchmesser vergleichbar mit der Größe eines normalen Erythrozyten
- Kernchromatin heterogen, schollig
- Zytoplasma schmal, hell basophil mit glatter Begrenzung

Neben den Standardlymphozyten lassen sich außerdem im Ausstrich maximal 10% granulierte Lymphozyten nachweisen (= large granular lymphocyte, kurz LGL). Dabei handelt es sich biologisch entweder um NK-Zellen oder zytotoxische T-Zellen, die Positivität für CD8 aufweisen. Zytologische Charakteristika sind: Etwas größer als der Standardlymphozyt, ein etwas breiteres blass basophiles Zytoplasma sowie eine punktförmige azurophile Granulation.

LGL-Zellen dürfen beim Gesunden nur bis zu maximal 10% aller kernhaltigen Zellen ausmachen. Überschreitet ihre Anzahl diese Grenze, so werden sie als atypische Lymphozyten eingestuft. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass einzelne aktivierte Lymphozyten mit etwas weiterem Zytoplasmasaum auch beim Gesunden vorkommen können. Diese sind prozentual jedoch zu vernachlässigen (Abb. 2; Bild 4).

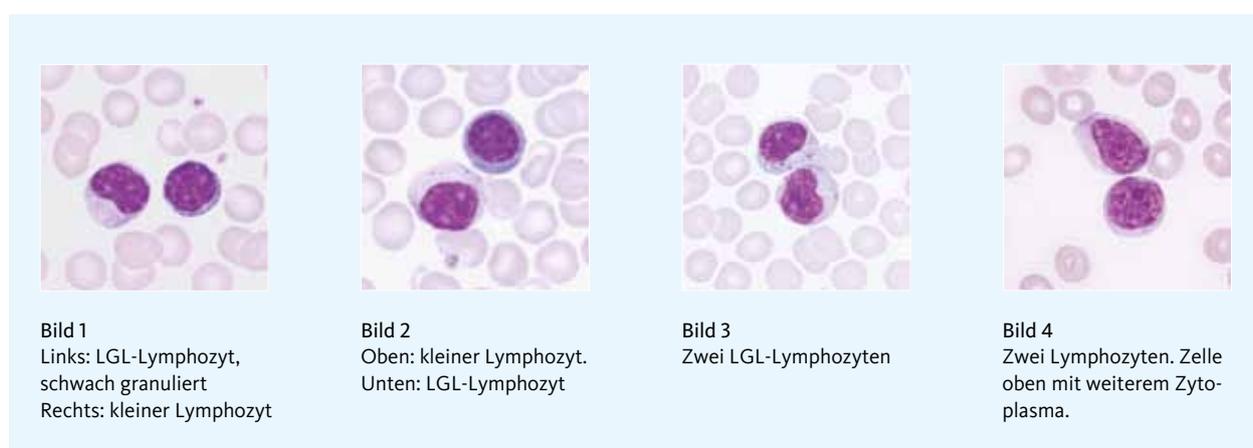


Abb. 2 Beispiele für Standardlymphozyten

Pathologische Veränderungen. Atypische lymphatische Zellen

Sowohl reaktive Krankheitsbilder (z. B. Virusinfektionen) als auch Neoplasien (z. B. Lymphome) können der Grund für eine Ausschwemmung ungewöhnlich aussehender Lymphozyten ins periphere Blut sein. Nach der neuen Lymphozyteneinteilung 2011 werden diese unabhängig von der Ursache als »atypisch« bezeichnet. Dabei bedeutet »atypisch« ein in der Pappenheimfärbung von der Norm (= Standardlymphozyt oder LGL-Zelle) abweichendes Aussehen. Dabei zeigen reaktive Veränderungen in der Regel ein »buntes« Bild mit gleichzeitigem Vorhandensein unterschiedlicher Lymphozytenformen.

Maligne Erkrankungen des lymphatischen Systems (Maligne Lymphome der B-, T- oder NK-Zellreihe), die klonale Erkrankungen darstellen, können, neben der Lymphozytenvermehrung, charakteristische, sich wiederholende zytologische Atypien aufweisen, so dass im Unterschied zu reaktiven Erkrankungen eine Gleichförmigkeit, d. h. eine Monomorphie des Lymphozyten-Bildes resultiert [10]. Klinisch-morphologisch unterscheidet man außerdem zwischen indolenten, d. h. meist langsam verlaufenden, und aggressiven Lymphomen. Die Lymphomzellen der indolenten Formen erscheinen in der Regel reifzellig, die der aggressiven Formen meist unreif, blastär. Eine weitergehende immunphänotypische Zuordnung, eine histologische Diagnostik sowie ergänzende zyto- und molekulargenetische Untersuchungen sind zur weiteren Klassifizierung und prognostischen Bewertung unerlässlich [9].

Lymphozyten-Differenzierung

Die Benennung und Einteilung der Lymphozyten war bislang in Deutschland nicht standardisiert. Insbesondere der Begriff der atypischen Lymphozyten wurde auf zwei verschiedene Weisen angewendet und interpretiert. Die Ringversuchszentren z. B. verlangten seit Anfang der 90-er Jahre (in Anlehnung an eine Empfehlung der DGHO), diesen Begriff ausschließlich für maligne lymphatische Zellen, streng getrennt von den Reizformen, zu verwenden. In der Routine dagegen wurde die Bezeichnung »atypischer Lymphozyt« von einem Teil der Anwender für alle morphologisch auffälligen Lymphozyten verwendet, unabhängig von der Ursache. Diese unterschiedliche Auslegung der Bezeichnung »atypisch« war missverständlich in der Interpretation und Weitergabe/Kommunikation von zytologischen Befunden, was im schlimmsten Fall eine Fehldiagnose nach sich ziehen konnte. Die klare Definition dieser Begriffe und eine standardisierte Vorgabe zur Zuordnung stellte somit das wichtigste Ziel der Überarbeitung der Lymphozytendifferenzierung dar.

Alte Nomenklatur

Einteilung
Normale Lymphozyten
Reizformen = Virozyten
Atypische Lymphozyten = sämtliche neoplastische Formen

Neue Nomenklatur 2011

Primäre Differenzierung	Abschließende Einteilung
Typische Lymphozyten	Standardlymphozyten LGL-Zellen ($< 10\%$ aller Zellen)
Atypische Lymphozyten	Atypische Lymphozyten, vermutlich reaktiv Atypische Lymphozyten, vermutlich neoplastisch

Tab. 1 Vergleich alte und neue Differenzierung

Zusammenfassung der neuen Lymphozytendifferenzierung 2011 in 10 Merksätzen [3]

1. Lymphozyten werden unterteilt in 1. typische, 2. atypische Lymphozyten

Die Unterteilung erfolgt rein zytologisch. Dabei steht typisch für morphologisch unauffällig und gilt für den Standardlymphozyten (vgl. Abb. 2) und die LGL-Zelle zu maximal 10% aller Leukozyten. Alle anderen lymphatischen Zellen werden als atypisch bezeichnet [14].

2. Atypische Lymphozyten werden differenziert in: »vermutlich reaktiv« und »vermutlich neoplastisch«

Unter Berücksichtigung der Art und Häufigkeit der festgestellten Atypie sowie des Gesamtzellbildes werden die atypischen Lymphozyten weiter eingeteilt in »atypisch, vermutlich reaktiv« und »atypisch, vermutlich neoplastisch«. Es folgt eine kommentierende Beschreibung unter Verwendung der Bezeichnung anerkannter, zytologisch definierter Lymphozytentypen, wie z. B. Haarzellen, Prolymphozyten, Zentrozyten usw.

3. LGL-Zellen werden quantitativ erfasst

Der Anteil der granulierten Lymphozyten soll durch Mitzählen in der Differenzierung erfasst werden. Sind es weniger als 10% aller Leukozyten, gilt dies als normal und wird im Befund nicht erwähnt

4. LGL-Zellen, die mehr als 10% aller kernhaltigen Zellen ausmachen, gelten als atypisch

Beträgt der mitgezählte Anteil der granulierten Lymphozyten mehr als 10% der Gesamtleukozyten, so werden diese den atypischen Lymphozyten zugeordnet. Eine weitere Unterteilung in vermutlich reaktiv oder vermutlich neoplastisch wird gewünscht.

5. Die Kategorie »Diverse« bezeichnet zytologisch nicht sofort bestimmbare Zellen

Das sind unklare lymphatische oder nicht-lymphatische Zellen, deren Dignität für den betreffenden Untersucher nicht sofort bestimmbar ist. In dieser Rubrik können beispielsweise Plasmazellen erfasst werden.

6. »Diverse« Zellen müssen beschrieben werden

Bei Verwendung der Kategorie »Diverse« ist eine Beschreibung der Zellen zwingend erforderlich.

7. Kernschatten werden als eigene Gruppe mit differenziert, der Eigenname »Gumprecht« entfällt.

8. Erythroblasten werden exklusiv (nicht prozentual) erfasst, d. h. auf 100 Leukozyten angegeben

9. Bei Leukopenie werden 2 Ausstriche mit je 50 Zellen gezählt

Bei extremer Leukopenie, beispielsweise einem Wert unter 1000/ μ L sollen zur Vermeidung von Doppelerfassungen einzelner Zellen 2 Ausstriche mit je 50 Zellen gezählt werden.

10. Bei extremer Leukozytose werden 200 Zellen gezählt.

Bei sehr hohen Leukozytenzahlen, z.B. $>100000/\mu$ L oder vielen Kernschatten empfiehlt sich zur Verbesserung der Genauigkeit des Ergebnisses eine Differenzierung von 200 Zellen.

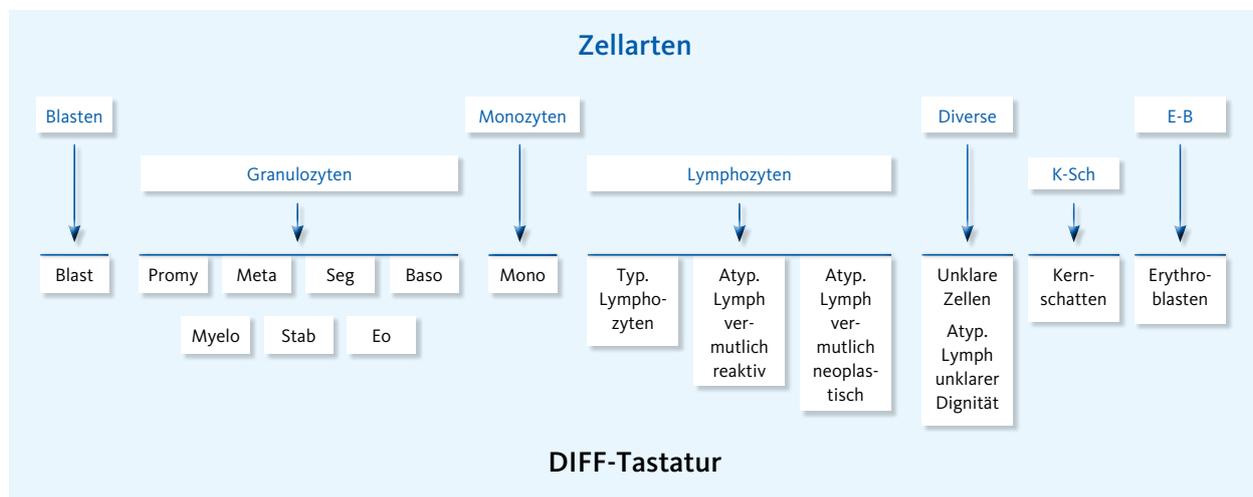


Abb. 3 Tastaturbelegung unter Berücksichtigung der neuen Lymphozyteneinteilung

Ein Jahr neue Lymphozyteneinteilung – Ein Resümee

Die wesentliche Neuerung 2011 stellt die zweistufige Vorgehensweise mit der vereinfachten, zunächst rein zytologischen Unterteilung in typische und atypische Lymphozyten dar. Erst im zweiten Schritt wird nach rein analytischer Vorgehensweise die Interpretation der gesehenen atypischen Zellen mit der Einteilung in vermutlich reaktiv/vermutlich neoplastisch getätigt. Da man in der Praxis aber diese Entscheidung direkt bei der Differenzierung treffen muss – die DIFF-Tastatur (Abb. 3) fordert unmittelbar die Eingabe eines atypischen Lymphozyten als entweder »vermutlich reaktiv« oder »vermutlich neoplastisch« – sind die Schritte der Erkennung und Interpretation letztlich notwendig miteinander verzahnt. Das heißt für die praktische Vorgehensweise, dass eine erste Vormusterung des Präparates in der Übersicht vor der Differenzierung erforderlich ist, um bereits einen Eindruck der Gesamtverteilung der Zellen zu erhalten (monomorph oder heterogen?) Zum anderen führt dies unter Umständen dazu, dass eine erfolgte erste Einordnung der jeweiligen Einzelzelle als »reaktiv« oder »neoplastisch« bei der abschließenden Beurteilung des Gesamt-Zellbildes wieder revidiert werden muss.

Durch den in der abschließenden Bewertung verwendenden Zusatz »vermutlich« wird ein begründeter Restzweifel an der Richtigkeit der Zuordnung ausgedrückt. Diese Einschränkung ist unbedingt erforderlich, da die zytologischen Möglichkeiten der Klassifizierung atypischer Lymphozyten begrenzt sind und häufig eine weitergehende Diagnostik, wie oben ausgeführt, erforderlich ist.

Die Gruppe »Diverse« ist ein Sammelbecken von Zellen, zu deren diagnostischer Bewertung der/die Primäruntersucher/-in Hilfe braucht, entweder durch erfahrene Kollegen/-innen und/oder durch additive diagnostische Verfahren wie Immunphänotypisierung, Histologie, Molekular- und Zytogenetik, sodass erst sekundär eine Benennung dieser zunächst nicht interpretierbaren Zellen möglich wird. Der wesentliche Vorteil hier ist eine Vermeidung von »zwanghaften« Falschzuordnungen mit der Folge der Reduzierung von Fehlerquellen für weniger erfahrene Untersucher. Außerdem wird durch die erforderliche Kommentierung vermieden, dass pathologische Formen mit auffälligen Merkmalen unter den Tisch fallen. Die Gruppe »Diverse« ist ebenso nützlich für selten vorkommende Zellen wie z. B. Plasmazellen oder Myelomzellen, für die es keine eigene Taste auf der DIFF-Tastatur gibt. Auch hier besteht aber die Notwendigkeit der kommentierenden Zellbeschreibung.

Die quantitative Erfassung der LGL-Zellen wird in der neuen Einteilung 2011 empfohlen. Dabei gelten sie nicht als eigene Gruppe, sondern werden entweder zu den typischen Lymphozyten (< 10%) oder bei Überschreitung der 10% zu den atypischen Lymphozyten gezählt. Da eine eigene Kategorie auf der DIFF-Tastatur nicht vorgesehen ist, erfasst man diesen Zelltyp am besten durch einfaches Mitzählen und Betätigen der Taste (typischer) Lymphozyt. Bei Überschreitung der 10% müssen sie von den typischen Lymphozyten abgezogen und der Kategorie atypische Lymphozyten zugeordnet werden. Eine LGL-Vermehrung > 10% der Leukozyten stellt im klinischen Umgang und diagnostisch ein Problem dar. Besonders in hämatologischen Speziallaboratorien kommt dieser Befund gar nicht selten vor, da dies u. a. therapieinduziert, besonders im Rahmen einer Stammzelltransplantation, auftreten kann. Bei gleichem Aussehen kann eine Neoplasie jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die geforderte Einteilung in vermutlich reaktiv oder vermutlich neoplastisch kann daher vom Untersucher im Labor meistens nicht geleistet werden, weil die klinischen Angaben häufig unzureichend sind und/oder eine weiterführende Diagnostik im Moment der Bewertung noch nicht vorliegt. Zunächst hilft hier eine Eingruppierung unter »Diverse« mit der Kommentierung: LGL-Zell-Vermehrung unklarer Dignität, weitere Abklärung erforderlich. Im weiteren klinischen Umgang mit LGL-Vermehrungen muss eine (klinikinterne oder übergreifende?) Strategie zum weiteren Prozedere entwickelt werden. Dies könnte sein: Zunächst Verlaufskontrollen und im Falle der Persistenz der LGL-Vermehrung eine weitere Abklärung (z. B. molekulargenetisch). Im Konfliktfall LGL-Vermehrung besteht weiterhin Diskussionsbedarf.

Die Lymphomzellen der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) erscheinen im Ausstrich in der Regel als typische Lymphozyten, obwohl die Zellen pathologisch sind. Hier leistet die neue Einteilung keinen Beitrag zur besseren Charakterisierung der Lymphomzellen. Dies liegt in den methodischen Grenzen der Zytologie begründet. Somit müssen funktional atypische Zellen in der Differenzierung als typisch eingestuft werden. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass die gültige Definition der CLL sich nicht allein auf die Zytologie beschränkt. Nach der WHO-Klassifikation 2008 lautet die diagnostische Mindestanforderung einer CLL: > 5 G/L B-Lymphozyten mit dem Antigenexpressionsmuster CD19⁺, CD5⁺, CD23⁺ [9].

Für pädiatrische Bereiche (Frühgeborene, Neugeborene, Kinder) gelten andere Normalverhältnisse der Lymphozytenquantität und Morphologie. Die Lymphozytennormwerte sind höher als bei Erwachsenen und die Morphologie zeigt eine größere Variabilität [8]. Die neue Lymphozytendifferenzierung bezieht sich bei der Definition des Normalen (typischen) jedoch ausschließlich auf die Verhältnisse bei Erwachsenen und berücksichtigt die Besonderheiten pädiatrischer Patienten nicht. Bei Verwendung der neuen DIFF-Tastatur ergeben sich hier zwangsläufig Befunde mit Vorkommen atypischer Lymphozyten, ohne dass dies als pathologisch zu bewerten wäre. Hier ist die von der DGHO gewünschte Vorgehensweise noch nicht klar definiert.

Lymphozytenformen in Bild und Text

Eine Übersicht der physiologisch und pathologisch vorkommenden Lymphozyten zeigen das Sysmex Lymphozytenplakat und die Lymphozytentafel, die in Zusammenarbeit mit der Abteilung Onkologie/Hämatologie und Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums Aachen entstanden sind.

Schlussbemerkung

Mit der neuen Einteilung der Lymphozyten können die Schwierigkeiten der Erkennung und Zuordnung pathologisch veränderter Lymphozyten nicht beseitigt werden. Auch die Anwendung in Spezialbereichen mit anderen Normalverhältnissen (z. B. Pädiatrie) ist noch unklar und lässt Fragen offen. Die einheitliche Sprachregelung führt jedoch zu einer eindeutigen Definition des Atypischen und ist somit ein wichtiger Schritt zur Standardisierung der mikroskopischen Differenzierung. Die Sensibilitätssteigerung für das Thema Lymphozytenveränderungen stellt außerdem einen positiven Nebeneffekt dar, der zu einer deutlichen Verstärkung der Weiterbildungsaktivitäten bei Einsendern und Anwendern geführt hat.

Literaturverweise

- [1] Arcaini L, Paulli M. (2010): Splenic marginal zone lymphoma. *Haematological*; 95:534–37.
- [2] Bagg A. (2011): *B cells behaving badly*. ASH. Educational booklet; p. 330.
- [3] Baurmann H, Bettelheim P, Diem H, Gassmann W, Nebe T. (2011): Lymphozytenmorphologie im Blutausstrich – Vorstellung einer überarbeiteten Nomenklatur und Systematik. *J Lab Med*; 35:261–70.
- [4] Caligiuri MA. (2007): Human natural killer cells. *Blood*; 112:461–69.
- [5] Cheson BD, JP Leonhard N. (2008): Monoclonal antibody therapy for B-cell Non Hodgkin's Lymphoma. *Engl J Med*; 359:613–26.
- [6] Foucar K et al. (2012): *Diagnostic pathology, blood and bone marrow*. Amirsys.
- [7] Fuchs R, Staib P, Brümmendorf T. (2012): *Manual Hämatologie*. 22. Auflage, Nora Verlag.
- [8] Gadner H et al. (2006): *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*, Springer.
- [9] Swerdlow SH et al. (ed.) (2008): *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues 4th edition*, IARC, Lyon.
- [10] Nguyen D et al. (2003): *Flow cytometry in hematopathology*. Humana press, Totowa.
- [11] Lennert K, Feller AC. (1990): *Histopathologie der Non-Hodgkin-Lymphome*. Springer Verlag, Berlin.
- [12] Leßien TW, Tedder TF. (2008): B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*; 112:1570–80.
- [13] Shakeen SP et al. (2012): Waldenström, Macroglobulinemia: A review of the entity and its differential diagnosis. *Adv Anat Pathol*; 19:11–27.
- [14] Wilcox RA. (2011): Cutaneous T-cell lymphoma: 2011 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol*; 86:929–48.
- [15] Young NS et al. (2006): *Clinical hematology*. Mosby.
- [16] Zhu J, Paul WE. (2008): CD4 T cells: fates, functions and faults *Blood*; 112:1557–69.

Autoren



Reinhild Herwartz
Biomedizinische Fachanalytikerin für Hämatologie
Universitätsklinikum Aachen
Klinik für Onkologie/Hämatologie und Stammzelltransplantation



Prof. Dr. med. Roland Fuchs
Universitätsklinikum Aachen
Klinik für Onkologie/Hämatologie und Stammzelltransplantation