

## Short Communications

### Evaluatie van flowcytometrische analyse van gefixeerde lymfklierbiopten

H.H.M. EIDHOF<sup>1</sup>, J. van BAARLEN<sup>2</sup> en R.W.L.M. NIESSEN<sup>1</sup>

Bij de analyse van lymfklierbiopten vindt er door de patholoog een histologische analyse plaats met behulp van conventionele histochemische en additionele immunochemische kleuringen, heden ten dage op formale gefixeerd en in paraffine ingebed materiaal. Met name is de intensiteit van de immunochemische kleuringen niet altijd makkelijk te beoordelen: expressie van oppervlakte-immunoglobulines voor het vaststellen van poly- of monoklonaliteit is in de praktijk niet mogelijk en kan zwakke expressie van specifieke CD-markers tot fout-negatieve beoordelingen leiden, dit in tegenstelling tot flowcytometrische analyse. Omdat het te onderzoeken materiaal voor onderzoek wordt aangeboden op een andere lokatie (het pathologielaboratorium is in Enschede gevestigd), dan waar de flowcytometrie plaats vindt (Ziekenhuisgroep Twente (ZGT) te Almelo) en het materiaal ook soms op ongunstige tijden binnenkomt, is er vaak geen vers materiaal beschikbaar voor onderzoek. Bewaarmedia zoals RPMI1640/FCS of HBS/BSA, kunnen wel voor kortdurende preservatie van het celmateriaal zorgen. Er kan echter niet worden uitgesloten dat er activatie, apoptose of verdere necrose optreedt van de cellen, als deze langer dan 24 uur bewaard worden. Op het klinisch laboratorium van de ZGT is er al vele jaren ervaring met rondzending van BAL-cellen nadat er milde fixatie van de cellen heeft plaatsgevonden, zodat deze nog goed reageren bij immunofenotypering. Onderzocht is nu, of ook op lymfkliermateriaal (of ander weefsel) deze methode kan worden toegepast en wat de toegevoegde waarde is van deze flowcytometrische analyse met betrekking tot de histologische analyse.

#### Methoden

Tussen mei 2007 en april 2008 is van 90 lymfklierbiopten en 1 stukje thymusweefsel, die ter analyse werden aangeboden aan het laboratorium pathologie, tevens een maximaal 1 mm dun fragment van het materiaal uitgesneden en mild gefixeerd in een formaldehyde/PBS-oplossing (4 °C) welke binnen 72 uur verwerkt en geanalyseerd werden op het klinisch laboratorium. Hierbij werden de cellen los geschraapt, gefiltreerd en de resterende celsuspensie, indien mo-

gelijk, op een concentratie gebracht tussen de  $10^5$ - $10^6$  cellen per ml, waarna een screenend 5-kleurenpanel voor immunofenotypering op de FC500 flowcytometer (Beckman Coulter) werd ingezet. Dit omvatte 3 buisjes, waarin:

- 1: CD4 Fitc, CD8 PE, HLADr ECD, CD45 PerCp, CD3 PCY7;
- 2: CD5 Fitc, CD56 PE, CD19 ECD, CD45 PerCp, CD3 PCY7;
- 3: Kappa Fitc, Lambda PE, CD19 ECD, CD20 APC, CD45 PCY7.

Indien bij deze analyse mogelijke afwijkingen naar voren kwamen werden aanvullende panels ingezet. De immunofenotypering vond plaats m.b.v. de 'lyse-no-wash'procedure.

Bij validatie van deze methode van analyse van biopten, is er gekeken, naar celverlies en markerverlies van de cellen die gedurende de validatieperiode in het fixatiemedium werden bewaard. Deze validatie heeft plaats gevonden op normaal lymfkliermateriaal en thymusweefsel waarbij gefixeerd materiaal geanalyseerd is op dag 1, 2 en tevens op dag 5 (lymfklier) en dag 7 (thymus) flowcytometrisch en op een Sysmex XE-2100 celteller in verband met de absolute celopbrengst.

#### Resultaten

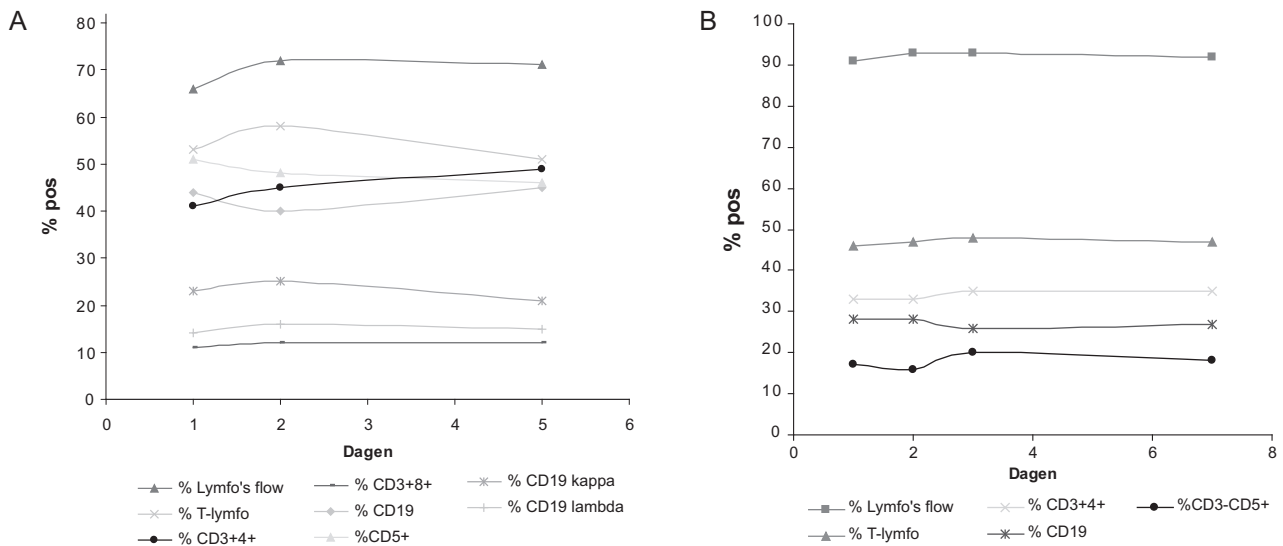
Bij de houdbaarheidstesten was er geen significante verandering aantoonbaar met betrekking tot de celconcentraties en de percentages lymfocytensubpopulaties gedurende de 7 dagen dat er getest is. Bij de immunofenotypering nam de fluorescentie-opbrengst van enkele antistoffen in de tijd wel af (2-7 % per dag in fixatie medium), hetgeen echter geen verlaagd percentage positiviteit veroorzaakte (zie figuur 1).

Van alle 91 biopten werden er uiteindelijk 35 als reactief, 32 als NHL, 14 als M. Hodgkin en 10 als tumorinfiltratie afgegeven door de PA (zie tabel 1). Hierbij lag de toegevoegde waarde van de flowcytometrische analyse met name in de ondersteuning van het reactieve beeld bij aantonen van polyklonaliteit. Bij de NHL was dit vooral het bevestigen van monoklonaliteit of afwezigheid van polyklonaliteit en de positiviteit van specifieke CD-markers, die soms flowcytometrisch beter te analyseren zijn dan op de coupes, ook met toepassing van CD-markers die niet routinematig op paraffinecoupes worden toegepast (bijvoorbeeld CD19 en 22).

#### Conclusie

*Klinisch-chemisch laboratorium, Ziekenhuisgroep Twente, Almelo<sup>1</sup> en Laboratorium Pathologie Oost-Nederland, Enschede<sup>2</sup>*

E-mail: R.Niessen@zgt.nl



**Figuur 1.** Percentage positieve lymfocytensubpopulaties in gefixeerd lymfklier materiaal (A) en thymusweefsel (B), weergegeven over een periode van respectievelijk 5 en 7 dagen.

Ten behoeve van het analyseren van mild gefixeerde lymfeklierbiopten, is het goed mogelijk om dit materiaal ook na meer dan 72 uur bewaren, nog te analyseren op hematologische maligniteiten. Als gevolg van het fixeren en bewaren van het lymfklier materiaal treedt er over het algemeen een gering markerverlies op, dat echter niet leidt tot onderwaardering van positiviteit voor de onderzochte antistoffen en kappa/lambda-analyse. Verder is er geen celverlies of verandering van subpopulaties gezien tijdens de bewaartijd tot 7 dagen. Op deze manier kan het mild gefixeerde klier materiaal ook na meer dan 72 uur goed flowcytometrisch geanalyseerd worden. Hoewel in veel gevallen de histologische analyse voldoende conclusief bleek, werd er ook een duidelijke toegevoegde waarde geconstateerd bij de flowcytometrische analyse, met name bij enkele specifieke markers (CD10, CD11c, CD15, CD25, CD103) en bij de monoklonaliteitsanalyse. Er is in dit onderzoek bewust gekeken naar het opsporen

van hematologische maligniteiten en in overleg met het PA-lab geen extra aandacht geschonken aan het opsporen van tumorcellen in het biopt of het vaststellen van M. Hodgkin, daar dit flowcytometrisch extra inspanningen zou vergen (DNA-analyse en het inzetten van meerdere markers zoals CD30 en CD15). Belangrijkste argument hiervoor is dat het PA-lab geen problemen ondervindt bij het vaststellen van deze diagnoses. Daarnaast blijkt dat het flowcytometrisch vaststellen van M. Hodgkin veel vals negatieve resultaten geeft (1, 2). De reden dat enkele NHL niet zijn vastgesteld met behulp van flowcytometrie, is dat er bij dit materiaal wel afwijkingen werden geconstateerd (ontbreken van lichte ketens op B-cellen waardoor geen klonaliteit is vast te stellen, of het ontbreken van enkele pan-B-cel-markers), maar onvoldoende onderbouwing gevonden werd voor een B-NHL. In overleg met het PA-lab, met betrekking tot de morfologie en tezamen met het ontbreken van markers, is er door PA in deze gevallen wel een NHL geconstateerd.

Naar aanleiding van onze bevindingen blijkt dat mild gefixeerd lymfklier materiaal ook na langere tijd bewaren, nog goed te onderzoeken is op hematologische maligniteiten, waarbij waardevolle aanvullingen worden gezien van de flowcytometrische analyse ten opzichte van de histochemische methoden.

**Tabel 1.** Overzicht lymfklierbioptanalyse-pathologie en flowcytometrie

PA conclusie	Totaal	Flow = PA	Flow: te weinig materiaal	Flow ≠ PA
Reactief en gb	35	32	3	0
NHL*	32	24	2	6
Hodgkin	14	1	2	11
Niet hematologisch**	10	3	3	4

\*) 12 DLBCL, 6 FL, 5 MZL, 3 PTCL, 2 B-CLL/SLL, 2 MCL, 1 B-CLL/PLL transformatie, 1 Burkitt; DLBCL=diffuus large B-cellymfoom, FL=folliculair lymfoom, MZL=marginal zona lymphoma, PTCL=perifeer T-cellymfoom, B-CLL=B-chronische lymfatische leukemie, SLL=small lymphocytic lymphoma, MCL=mantelcellymfoom, PLL=prolymfocytenleukemie.

\*\*) 7 carcinomen, 1 seminoom, 1 adenoom en 1 thymoom

#### Referenties

- Martinez A, Aymerich M, Castillo M, Colomer D, Bello-sillo B, Campo E, Villamor N. Routine use of immunophenotype by flow cytometry in tissues with suspected hematological malignancies. *Cytometry B Clin Cytom* 2003; 56: 8-15.
- Ravoet C, Demartin S, Gerard R, Dehon M, Peny MO, Petit B, Delannoy A, Husson B. Contribution of flow cytometry to the diagnosis of malignant and non malignant conditions in lymph node biopsies. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 1587-1593.