

Aanbeveling minimale panels immuunfenotypische karakterisering hematologische maligniteiten

De minimale panels zijn vastgesteld na grondig overleg over interpretatie van de relevante classificaties en de onderliggende literatuur. Het expertpanel ressorteert onder het SKML-IMCD-bestuur en bestaat uit de volgende leden:

Peter van Balen, hematoloog, LUMC

Rik Brooimans, laboratoriumspecialist medische immunologie, Erasmus MC

Jan Emmerechts, klinisch bioloog, AZ Sint-Jan Brugge

Alice Gerrits, klinisch chemicus, Isala

Stefan Nierkens, medisch immunoloog, Prinses Maxima Centrum

Kees Meijer, klinisch chemicus, UMCG

Introductie

In dit document worden de minimale immuunfenotypische panels beschreven, opgesteld op basis van de WHO 2022¹ en ICC 2022². Deze panels omvatten de markers die minimaal moeten worden ingezet en gerapporteerd bij de SKML-Leukemie/Lymfoom rondzendingen en dienen tevens als een praktische handreiking voor de diagnostische toepassing van deze markers. Bovendien biedt dit document ondersteuning bij de classificatie van de verschillende hematologische maligniteiten.

Sinds de vorige versie van de minimale panels zijn er verschillende nieuwe classificaties geïntroduceerd, wat tot enige onduidelijkheid heeft geleid. De meest recente classificaties zijn de WHO-HAEM5 en de International Consensus Classification (ICC). Hoewel hierover nog geen formele afspraken zijn gemaakt, is er een algemene consensus dat voor lymfatische maligniteiten de WHO-HAEM5 dient te worden gevolgd, terwijl voor myeloïde maligniteiten de voorkeur uitgaat naar de ICC. Deze keuze is gebaseerd op de betere aansluiting van de ICC op de ELN-risicofructificatie en de klinische trials, waaronder die van HOVON. Voor lymfatische en overige niet-myeloïde hematologische maligniteiten kiest het expertpanel voor de WHO-HAEM5. Beide classificaties zijn gepubliceerd als artikel, maar ook beschikbaar in boekvorm, waarin meer details zijn beschreven: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Haematolymphoid-Tumours-2024> en <https://www.wolterskluwer.com/en/solutions/ovid/international-consensus-classification-of-myeloid-and-lymphoid-neoplasms-the-17036>

¹ Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* **36**, 1720–1748 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01620-2>.

² Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, *et al.* International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* **140**(11):1200-1228 (2022). <https://doi.org/10.1182/blood.2022015850>.

ACUTE LEUKEMIE

Tabel 1. Minimale panel acute leukemie - screening.

	Minimale panel 2024
CD45	Verplicht
CD34	Verplicht
cCD3	Verplicht
CD19	Verplicht
cMPO	Verplicht
CD10	Additioneel verplicht bij zwakke CD19 expressie
sCD22	Additioneel verplicht bij zwakke CD19 expressie
cCD79a	Additioneel verplicht bij zwakke CD19 expressie

Voetnoten:

Indien er verdenking is op een acute leukemie, maar de cellijn definiërende markers negatief zijn, dient men ten minste de volgende maligniteiten te overwegen en afdoende uit te sluiten: ALAL (zie ook de volgende voetnoten), BPDCN en AML met monocyttaire/megakaryocytaire/erytroïde uitrijping of AML met minimale differentiatie.

Met betrekking tot de categorie acute leukemias of ambiguous lineage (ALAL) duidelijke lijn van herkomst (ALAL): twee afzonderlijke lijn specifieke leukemie populaties (bilineage) of een leukemie populatie met expressie van meerdere lijn definiërende markers (van verschillende lijn - bifenotypisch). In geval van bilineage ALAL dienen beide populaties volledig getypeerd te worden volgens het panel voor myeloïd, B- of T-origine.

B-ALL met homogene expressie van typische B-cel markers én geïsoleerde MPO expressie (dus in afwezigheid van elke andere myeloïde marker zoals CD13 of CD33), verandert de diagnose niet.³

Bij MPAL, dient het totaal aantal afwijkende subpopulatie < 5% van het totaal aantal cellen te bedragen, dat heeft het conform de ICC de voorkeur dit te beschrijven als subkloon bij de dominante leukemische populatie, bijvoorbeeld 'voornamelijk B-ALL met een kleine leukemische populatie met myeloïde lijn specificiteit van onbekende klinische betekenis'. Indien er op myeloïde of T-lymfatische blasten CD19 expressie aantoonbaar is, dienen aanvullende B-celmarkers (CD10, CD22, cCD79a) ingezet te worden om een MPAL uit te sluiten (additioneel verplicht).

³ Weinberg et al. The International Consensus Classification of acute leukemias of ambiguous lineage. *Blood*, 2023; 141: 2275

Een MPAL met een monocyttaire blastenpopulatie wordt dermate zeldzaam geacht door het expertpanel dat de markers CD11c, CD14 en CD64 niet verplicht worden gesteld. Uiteraard dient men alert te zijn op AML-populaties met monocyttaire uitrijping indien andere cellijn-definiërende markers negatief zijn.

Acute undifferentiated leukemias (AUL): geen expressie van markers die myeloïde of lymfatische lijn definiëren én niet meer dan één lijn geassocieerde marker (bijvoorbeeld CD13 óf CD33, niet samen) N.B. in afwezigheid van cMPO, definiëren twee of meer van de volgende markers een AML boven een AUL: CD117, CD13, CD33.

ALAL-NOS: een zeer complexe entiteit, waarbij meerdere cellijn-geassocieerde markers tot expressie komen in afwezigheid van cellijn definiërende markers, bijvoorbeeld T-cel markers CD5 en CD7 in combinatie met CD13 en CD33, maar in afwezigheid van cCD3 en cMPO. Opgelet, de expressie van $\geq$ myeloïde markers (CD13, CD33 en/of CD117) i.c.m. één T-cel- (bijvoorbeeld CD7) of B-cel marker (CD19+ zwak) is meer passend bij een AML met aberrante markerexpressie.

N.B. De WHO en de ICC hanteren verschillende definities van expressiesterkte. Het expertpanel volgt bij de beoordeling de definitie van de WHO: expressie van CD19 minstens 50% overlappend met normale B-cel progenitoren op minstens een deel van de leukemie.

ACUTE MYELOIDE LEUKEMIE (AML)

Tabel 3. Minimale panel AML.

	Minimale panel 2024	Opmerkingen
CD45	Verplicht	
CD34	Verplicht	
CD117	Verplicht	
CD13*	Verplicht	
CD33	Verplicht	Target voor therapie; Cave polymorfisme
cMPO	Verplicht	
CD11c	Sterk aanbevolen	Ondersteunend in de diagnose AML met monocyttaire uitrijping
CD64	Sterk aanbevolen	Ondersteunend in de diagnose AML met monocyttaire uitrijping
CD14	Sterk aanbevolen	Ondersteunend in de diagnose AML met monocyttaire uitrijping
CD36	Sterk aanbevolen	Ondersteunend bij onderscheid monocytair/erytroid/ megakaryocytair
CD41/CD61	Sterk aanbevolen	Ondersteunend bij aantonen myeloïde lijn bij afwezigheid andere markers, passend bij megakaryocyttaire lijn
CD235a	Sterk aanbevolen	Ondersteunend bij aantonen myeloïde lijn bij afwezigheid andere markers, passend bij erytroïde lijn
CD300e	Sterk aanbevolen	Ondersteunend bij onderscheid onrijp en rijp monocytair
HLA-DR	Sterk aanbevolen	Ondersteunend bij onderscheid rijp versus onrijp myeloïd en uitrijping verschillende AML. Doorgaans positief bij meeste AML, megakaryocyttaire en monocyttaire afwijkingen en negatief bij o.a. APL en CD34- AML (m.n. NPM1 gemuteerd).

* CD13 is geen harde eis o.b.v. ICC 2022, dit wordt in het expertpanel echter wel als belangrijke panmyeloïde marker beschouwd (ook t.b.v. ALAL, monocyttaire AML en eventuele MRD-analyses).

B-CEL ACUTE LYMFATISCHE LEUKEMIE (B-ALL)

Tabel 4. Minimale panel B-ALL.

	Minimale panel 2024
CD45	Verplicht
CD34	Verplicht
CD10	Verplicht
nTdT	Verplicht
CD19	Verplicht
CD20	Verplicht
sCD22	Verplicht
cCD79a	Verplicht
clgM	Sterk aanbevolen

Het kan behulpzaam zijn om het differentiatie stadium te benoemen (o.a. gebruikt in studies, prognostische waarde niet evident):

- Pro-B ALL: CD10-/clgM-
- Common B-ALL: CD10+/clgM-
- Pre-B ALL: CD10+/clgM+
- Soms slgM zonder lichte keten (dan transitionele pre-B ALL)

Therapeutisch is het van belang om de mate van CD20 expressie van de B-ALL blasten vast te stellen. Indien CD20 tot expressie komt op $\geq 20\%$ van de blasten wordt gesproken van een CD20-positieve B-ALL en wordt anti-CD20 therapie aan de behandeling toegevoegd.

T-CEL ACUTE LYMFATISCHE LEUKEMIE (T-ALL)

Tabel 5. Minimale panel T-ALL.

	Minimale panel 2024	Opmerkingen
CD45	Verplicht	
CD1a	Verplicht	Marker voor corticale T-cellen. Verplicht negatief bij ETP
CD34	Verplicht	In het kader van ETP (o.a.)
CD99	Verplicht	
nTdT	Verplicht	
(c)CD3	Verplicht	
CD5	Verplicht	Grotendeels negatief bij ETP
CD8	Verplicht	Verplicht negatief bij ETP
CD13	Verplicht	In het kader van ETP
CD33	Verplicht	In het kader van ETP
CD117	Verplicht	In het kader van ETP
HLA-DR	Verplicht	In het kader van ETP
CD2	Sterk aanbevolen	Pan T-cel marker
CD7	Sterk aanbevolen	Pan T-cel marker
CD11b/CD15/CD65	Sterk aanbevolen	Indien verdenking ETP en overige myeloïde markers negatief
CD56	Sterk aanbevolen	Bij verdenking zeldzame acute NK-cel leukemie

Voetnoten:

Er zijn verschillende uitrijpingsstadia binnen de T-ALL, waarbij enkel de Early T-cell Precursor (ETP) ALL als geaccepteerde sub-entiteit wordt beschouwd in zowel WHO als ICC, vanwege een mogelijke slechtere prognose en het moleculaire profiel. De diagnose wordt gesteld o.b.v. immuunfenotype, waarbij de WHO-definitie wordt aangehouden:

1. cCD3+, sCD3- (zeer zeldzaam positief, maar volgens expertpanel niet sterk positief of i.c.m. TCR)
2. MPO- (<10% met flowcytometrie, <3% met cytochemie)
3. CD1a en CD8 negatief
4. $\geq 25\%$ van de blasten met minimaal één van de volgende myeloïde / stamcel markers
5. CD5 negatief of zwak (<75% van de blasten); indien > 75% en er wordt voldaan aan 1-4, dan near-ETP ALL. Zwakke expressie wordt gedefinieerd als een MFI minstens 1 log zwakker dan normale T-cellen (waarbij normale T-cellen minstens 2 log sterker zijn dan de negatieve controle).

BLASTAIR PLASMACYTOID DENDRITISCHE CEL NEOPLASMA (BPDCN)

Tabel 6. Minimale panel BPDCN.

	Minimale panel 2024	Verwachte expressie
CD45	Verplicht	+
CD4	Verplicht	+
CD34	Verplicht	-
CD56	Verplicht	+
CD123	Verplicht	+
CD303	Sterk aanbevolen	+
CD304	Sterk aanbevolen	+
cTCL1	Sterk aanbevolen	+

Diagnostische criteria WHO 2022:

Expressie van CD123 en eventueel 1 andere plasmacytoïde dendritische marker* (cTCL1, CD303, CD304), naast CD4 en/of CD56
of

Expressie van drie plasmacytoïde dendritische markers* (CD123, cTCL1, CD303, CD304) en afwezige expressie van alle verwachte negatieve markers (CD3, CD14, CD19, CD34, cMPO).

Voetnoten:

Positiviteit van CD34 maakt dat voorkeur moet worden gegeven aan AML met pDC-uitrijping boven BPDCN (zie hiervoor het WHO-hoofdstuk over Mature plasmacytoid dendritic cell proliferation associated with myeloid neoplasm MPDCP)

In de differentiaaldiagnose van BPDCN staan onder andere rijpe pDC afwijkingen, deze worden voorlopig buiten beschouwing gelaten (zie MPDCP).

TCF4 wordt door WHO 2022 als pDC-marker genoemd, omdat de beschikbaarheid zeer beperkt en het gebruik door experts onduidelijk is, wordt deze marker voorlopig buiten beschouwing gelaten.

RIJPE B-CEL MALIGNITEITEN (MBCN)

Tabel 7. Minimale panel MBCN.

	Minimale panel 2024	Opmerkingen
CD45	Verplicht	
CD19	Verplicht	
CD20	Verplicht	
CD5	Verplicht	
CD23	Verplicht	
CD200	Verplicht	
CD10	Verplicht	
CD38	Verplicht	
IgKappa	Verplicht	
IgLambda	Verplicht	
CD103	Additioneel verplicht	Bij verdenking HCL en SBLPN
CD11c	Additioneel verplicht	Bij verdenking HCL en SBLPN
CD25	Additioneel verplicht	Bij verdenking HCL en SBLPN
CD79b	Sterk aanbevolen	Negatief/zwak bij CLL, positief bij andere B-NHL en normale rijpe B-cellen
CD43	Sterk aanbevolen	Positief bij CLL, negatief op normale B-cellen
Surface Ig zware keten	Sterk aanbevolen	Zwak bij CLL (meestal IgD/IgM)
CD22	Sterk aanbevolen	Negatief/zwak bij CLL
CD123	Sterk aanbevolen	Sterk positief bij HCL
nTdT	Sterk aanbevolen	Uitsluiten B-ALL bij Burkitt Lymfoom

Tabel 8. Meest karakteristieke markerprofielen voor de meest voorkomende MBCN.

	Normale rijpe B-cellen	CLL	MCL	HCL	SBLPN *	Kiemcentrum lymfomen	LPL
Minimale markers							
CD45	+	+	+	+	+	+	+
CD19	+	+	+	+	+	+	+
CD20	+	zw	+	+/++	+/++	+	+
Kappa/Lambda	+ (>0.3:1 en <3:1)	zw	+	+	+	+	+
CD5	- †	+	+	-	-	-	-
CD10	-	-	-	-	-	+	-
CD103	-	-	-	+	+	-	-
CD11c	-	-	-	+/++	+/++	-	-
CD23		+	-/zw	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	-
CD200	-/zw	+	-	+/++	-/zw	n.v.t.	+
CD38	-	n.v.t.	30-40% pos	n.v.t.	n.v.t.	sterk bij BL	vaak +
CD25	-	n.v.t.	n.v.t.	+	-	n.v.t.	n.v.t.
Aanvullende markers							
CD79b	+	-/zw	+	+	+	+	+
CD43	-	+	+	n.v.t.	n.v.t.	-	n.v.t.
Surface Ig	+	zw (vaak IgM/IgD)	+(IgM/IgD)	+/++	+/++	+	+(IgM)
FSC	laag	laag	laag (blastaire variant hoog)	verhoogd	verhoogd	FL: laag; BL en DLBCL hoog	laag
SSC	laag	laag	laag	verhoogd	verhoogd	FL en BL laag; soms hoog bij DLBCL	laag

* Hairy cel leukemie variant is als entiteit in de WHO2022 geschrapt en vervangen door splenisch B-cellymfoom/leukemie met prominente nucleoli (SBLPN), maar in de ICC2022 is de naam HCL-variant behouden.

†Zwakke CD5 expressie kan ook voorkomen op bepaalde subpopulaties van hematogonen en rijpe B-cellen.

Chronische lymfatische leukemie (CLL) en monoklonale B-cel lymfocytose (MBL)

Kenmerkend immuunfenotype: De circulerende B-cellen brengen CD19 tot expressie en hebben een verzwakte expressie t.o.v. normaal voor de marker CD20, verder zijn de cellen typisch positief voor CD5, CD23 en CD200; CD10 is negatief. Deze combinatie van markers onderscheid CLL van andere MBCN. Eventueel kunnen de volgende markers van ondersteunend belang zijn: surface IgM/IgD (zwak), CD22 (zwak), CD43 (pos) en CD79b (neg/zwak). De WHO noemt ROR1 en CD81 als aanvullende markers in moeilijke gevallen en in het kader van MRD. Na evaluatie van de literatuur en omdat MRD geen rol heeft binnen de minimale panels, heeft het expertpanel besloten deze markers vooralsnog buiten de minimale panels te laten en te wachten tot er in de literatuur of binnen de deelnemende laboratoria meer helderheid en consensus is.

Een geïntegreerd score systeem (Matutes; The European Research Initiative CLL, ERIC) kan behulpzaam zijn bij het stellen van de diagnose. Sommige casus hebben een atypisch immuunfenotype (CD5 negatief, CD23 negatief, sterke Ig expressie of sterkere CD79b of CD20 expressie).

Voor de diagnose CLL dient het absolute aantal monoklonale B-cellen te zijn $\geq 5 \times 10^9/L$. Indien $< 5 \times 10^9/L$, dan is er sprake van een **monoklonale B-cel lymfocytose (MBL)** of small lymphocytic leukemia (SLL). CLL-type MBL heeft verhoogde kans op progressie naar CLL. MBL wordt o.b.v. de WHO-2022 criteria als volgt ingedeeld:

Low-count MBL ($< 0.5 \times 10^9/L$)

CLL/SLL-type MBL ($0.5-5 \times 10^9/L$); atypische-CLL type MBL (zoals gedefinieerd in WHO-2016) valt hier ook onder.

Non-CLL/SLL-type MBL ($< 5 \times 10^9/L$). Dit is elke non-CLL/SLL monoklonale B-celexpansie zonder symptomen of diagnostische eigenschappen van een ander rijp B-celneoplasma (hier is nog geen consensus over afkapwaarden). In dit geval is dus uitgebreid onderzoek naar lymfoomlokalisaties nodig.

Mantelcellymfoom (MCL)

Kenmerkend immuunfenotype: de CD19-positieve B-cellen brengen relatief intens lichte ketens tot expressie en zijn gewoonlijk positief voor CD5 en negatief voor CD200 en CD10. CD23 is negatief of zwak. Aberrante immuunfenotypes zijn beschreven (afwezig CD5, aanwezigheid CD10 in agressieve casus). Ondersteunende markers kunnen zijn zwakke expressie van surface IgM/IgD, CD43, CD79b pos, FMC7 pos (FMC7 is een epitoom van CD20 en wordt door het expertpanel als redundant beschouwd t.o.v. CD20). Immuunfenotypering is vooral ondersteunend en aanvullend onderzoek (95% van de casus t(11;14), cycline D1, SOX11-expressie, cytogenetica, en/of histologie van een lymfeklier) is nodig voor een definitieve diagnose.

N.B. SOX1-negatieve niet-nodale MCL, kan een ietwat ander fenotype hebben (o.a. CD200+), maar wordt hier buiten beschouwing gelaten.

Hairy cell leukemie (HCL)

Kenmerkend immuunfenotype: het klassieke immuunfenotype van Hairy Cell Leukemie (HCL) omvat sterke monotypische Ig expressie, sterke expressie van CD20 en CD11c. Tevens expressie van CD103, CD25, CD123 en CD200. De meeste casus zijn negatief voor CD5 en CD10, maar CD10 komt bij 10-20% voor en CD5 bij 1-2%. De sideward scatter (SSC) is vaak vergroot bij HCL, cave overlap monocytengate. Bij niet-specifieke immuunfenotypes maakt de aanwezigheid van de *BRAF* V600E mutatie (95% van de casus) de diagnose waarschijnlijker; tevens wordt een HCL gekenmerkt door een monocytopenie, dit in tegenstelling tot SBLPN.

Splenic B-cell Lymphoma/Leukemia with Prominent Nucleoli (SBLPN)

Dit betreft een groep van milt lymfomen/leukemieën die niet in één van de andere entiteiten past. Hieronder vallen B-celmaligniteiten die voorheen werden uitgeboekt als CD5- B-PLL. Het grootste deel van deze entiteit bestaat echter uit casus die voorheen verder gedefinieerd als HCL-variant. Dit is een rijpe B-celmaligniteit die qua morfologie en immuunfenotype lijkt op een klassieke HCL, maar een andere ziekte is en waar HCL-therapie niet werkzaam is. Om dit onderscheid duidelijk te maken is in de WHO 2022 gekozen de term HCLv te vervangen door de term splenisch B-cellymfoom/leukemie met prominente nucleoli (SBLPN). De ICC handhaaft de term Hairy Cell variant. Aangezien het fenotype (zoals in WHO tekst beschreven) vooral voldoet aan wat voorheen HCLv werd genoemd en de leukemie die voorheen als (CD5-) B-PLL werd geclassificeerd hier niet aan voldoet, zullen deze casus bij enkel immuunfenotypische benadering niet als SBLPN geclassificeerd kunnen worden, maar in een restcategorie belanden (MBCN-NOS).

Kenmerkend immuunfenotype: SBLPN casus hebben veel kenmerken gemeen met HCL, maar missen CD25.

Voetnoten:

In WHO 2022 worden HCL, SBLPN onder de milt lymfomen/leukemieën geschaard samen met Splenisch diffuus rode pulpa kleincellig B-cellymfoom (SDRPL). De overige milt en marginale lymfomen/leukemieën hebben een te weinig onderscheidend fenotype om ze binnen de huidige panels eenduidig te classificeren en deze worden daarom geschaard onder de categorie MBCN-NOS (not otherwise specified) en het onderzoek van de pathologie is doorslaggevend in de classificatie van deze lymfomen.

Milt (marginale) lymfomen/leukemieën kunnen wel degelijk CD103 en/of CD11c positief zijn, hoewel doorgaans zwakker dan HCL(v).

Kiemcentrum lymfomen (folliculair lymfoom (FL), Burkitt lymfoom (BL), diffuus grootcellig B-cellymfoom (DLBCL))

Kenmerkend immuunfenotype: CD10 positieve monoklonale B-cellen zonder kenmerken van HCL, SBLPN of LPL. Wees alert op een rijpere CD10+ B-ALL. Het folliculair lymfoom is in de regel een kleincellig lymfoom (lage forward scatter –FSC), terwijl Burkitt lymfoom en het DLBCL gekenmerkt worden door (zeer) hoge FSC en soms ook hogere SSC. In sommige gevallen kan CD20 negatief zijn bij DLBCL.

N.B. Kiemcentrumlymfomen kunnen ook CD10 negatief zijn en ook zijn er non-kiemcentrum DLBCL, die worden hier buiten beschouwing gelaten en zijn voer voor pathologen (o.a. BCL2, BCL6 en MYC analyses). Bij verdenking op Burkitt lymfoom adviseert WHO om nTdT te bepalen om een B-ALL uit te sluiten en relatief sterke CD38 expressie in het onderscheid met andere grootcellige B-cellymfomen.

Lymfoplasmacytair lymfoom (LPL)

Kenmerkend immuunfenotype: er is niet een eenduidig immuunfenotype onderscheidend voor LPL. LPL wordt gekenmerkt door monoklonale B-cellen en plasmacellen. IgM expressie zonder IgD en plasmacytaire uitrijping zijn de sterkste aanknopingspunten, maar ook dan moeten andere kleincellige lymfomen die plasmacytair kunnen uitrijpen, zijn uitgesloten. LPL is vaak geassocieerd met een M-proteïne, meestal IgM, maar is niet nodig voor de diagnose (indien een M-proteïne aanwezig is spreekt men van de ziekte van Waldenström).

De B-cellen kunnen surface of alleen cytoplasmatisch Ig tot expressie brengen (typisch IgM zonder IgD, echter IgM/IgD is mogelijk) en tevens CD19, CD20, CD22 en typisch negatief voor CD5, CD10, CD103 en CD23 met frequente expressie van CD38 (normaal alleen positief in onrijpe B-cellen en cellen afkomstig uit het kiemcentrum, hoewel een deel van CLL en MCL casus ook CD38-positief zijn). Een minderheid is CD5 of CD10 positief. De plasmacellen zijn CD138 positief met synthese van IgM en Kappa/Lambda restrictie, maar zonder typische aberrante markerexpressie, zoals bij non-IgM MGUS/MM wordt waargenomen. WHO-2022 noemt CD25 als een marker die behulpzaam kan zijn, maar de waarde van CD25 is voor het expertpanel onduidelijk: uit de literatuur blijkt dat CD25 bij andere MBCN ook positief is en bij LPL slechts bij ca. 32%, dus de aanvullende waarde lijkt minimaal en eerder schijnzekerheid te geven en wordt niet overgenomen in het minimale panel. Bij verdenking op LPL kan mutatieanalyse naar MYD88 worden ingezet om de diagnose waarschijnlijker te maken, omdat mutaties (m.n. L256P) in >90% van de casus aanwezig zijn. Deze mutatie is echter niet specifiek voor LPL en daarmee geen diagnostisch criterium.

PLASMACEEL MALIGNITEITEN (PCM)

Tabel 9. Minimale panel PCM.

	Minimale panel 2024	Opmerkingen
CD45	Verplicht	Zwak of negatief (70-75%)
CD38	Verplicht	
CD138	Verplicht	
CD19	Verplicht	Negatief (>95%)
CD56	Verplicht	Positief (60-80%)
CylgKappa	Verplicht	
CylgLambda	Verplicht	
CD27	Sterk aanbevolen	Deel van de casus negatief
CD81	Sterk aanbevolen	Deel van de casus negatief
CD20	Sterk aanbevolen	Aberrante expressie
CD28	Sterk aanbevolen	Aberrante expressie
CD117	Sterk aanbevolen	Aberrante expressie
CD229 en/of CD319	Sterk aanbevolen	Na anti-CD38-therapie: additionele plasmacel definiërende marker, sterke expressie
clgM	Sterk aanbevolen	LPL

Voetnoten:

CD28 en CD56 komen ook deels op normale plasmacellen voor.

Na behandeling met anti-CD38 therapie (o.a. Daratumumab en Isatuximab) kan de immuunfenotypische expressiesterkte van CD38 door verschillende oorzaken verminderd zijn. Om plasmacellen toch goed te kunnen detecteren kan gebruik gemaakt worden van alternatieve markers (zie volgende punt) of aangepaste anti-CD38 markers zoals mutli-epitop, nanobody, of VS38c.

CD229 en CD319 kunnen als alternatieve plasmacel markers gebruikt worden bij monoklonale antilichaamtherapieën gericht tegen CD38 of CD138.

IgM multiple myeloom/MGUS is te onderscheiden van LPL doordat LPL geen afwijkende markers tot expressie brengt.

RIJPE T-CEL (+NK-CEL) MALIGNITEITEN (MTCN)

Tabel 10. Minimale panel MTCN.

	Minimale panel 2024	Opmerkingen
CD45	Verplicht	
CD2	Verplicht	
CD3	Verplicht	
CD4	Verplicht	
CD5	Verplicht	
CD7	Verplicht	
CD8	Verplicht	
CD56	Verplicht	
TCR-GD	Verplicht	
TRBC1 of V -kit	Verplicht	Klonaliteit
CD57	Additioneel Verplicht	T-LGL
cTCL1	Additioneel verplicht	T-PLL
CD25	Additioneel verplicht	ATLL
CD26	Additioneel verplicht	SS/MF
CD16	Sterk aanbevolen	NK-LGL
CD94	Sterk aanbevolen	NK-LGL
CD158a/b/e/	Sterk aanbevolen	NK-LGL
HLA-DR	Sterk aanbevolen	NK-LGL
CD279	Sterk aanbevolen	AITL
CD30	Sterk aanbevolen	ALCL
CD11c	Sterk aanbevolen	T/NK-LGL
CD52	Sterk aanbevolen	T-PLL / target alemtuzumab
TRBC2	Sterk aanbevolen	Klonaliteit

Achtergrond

In de WHO 2022 bestaat de subgroep rijpe T- en NK-cel leukemieën uit T-PLL, T-LGL, NK-LGL, ATLL, Sézary syndroom en agressieve NK-cel leukemie. De systemische lokalisatie van MTCN in perifere bloed of beenmerg is zeldzaam. Klonaliteit van T-cellen kan vastgesteld worden middels moleculair onderzoek naar TCR-hereniging of middel- β (het), waarschijnlijk op korte termijn aangevuld met TRBC2 voor een aantal MTCN met leukemische of systemische presentatie vanuit primair cutane of nodale oorsprong, is er een belangrijke (ondersteunende) rol voor de immuunfenotypering weggelegd. Het is essentieel te beseffen dat fenotypes gevonden door de patholoog verschillend kunnen zijn van de fenotypes die in het bloed/beenmerg worden aangetroffen; dit kan verklaard worden door zowel verschil in monoklonalen en analytische aspecten, als verschil in expressie van de tumorcellen per lokalisatie.

Het immuunfenotype van de verschillende T-CLPD is heterogeen, met wisselende expressie van pan T-celmarkers binnen een entiteit (CD2, CD3, CD5, CD7). Verminderde expressie of afwezigheid van deze pan T-celmarkers is vaak de meest evidente immuunfenotypische afwijking, naast een sterk verschoven CD4:CD8-ratio. Gezien de heterogeniteit is enige terughoudendheid in het primair leukemische entiteiten, waar l. Met gap strategieën dient men niet te alert zijn op sCD8-negatieve T-cel (sub)populaties. Verlies van CD45 is weinig entiteit-specifiek, maar wel sterk indicatief voor een afwijkende T-celpopulatie.

Cellijn definiërend: cCD3, sCD3. Bij afwezigheid van sCD3 dient men extra alert zijn op een T-ALL/LBL, zet bij twijfel ook het minimale panel voor T-ALL/LBL in.

Klonaliteit van T-cellen middels flowcytometrie

Tot voor kort was afwijkende expressie van CD2, CD3, CD5 en/of CD7 vaak de meest evidente aanwijzing voor een T-celmaligniteit, bij gebrek aan een eenvoudige klonaliteitsmarker analoog aan Kappa/Lambda bij de B-cellen. De kit is nog in ontwikkeling, maar is een complexe, dure en arbeidsintensieve kit, die maar door weinige laboratoria wordt gebruikt. Recent is er veel aandacht voor TRBC1, een antistof tegen het constante domein van de β -keten van de T-celreceptor (in geval van TCR- $\alpha\beta$). TRBC1 wordt in gelijke mate afgeschreven als TRBC2, maar antistoffen tegen TRBC2 zijn op moment van schrijven net op de markt; hier is nog weinig ervaring mee, deze marker wordt waarschijnlijk later toegevoegd aan de lijst met verplichte markers. In normale T-cellen zal een bimodale verdeling van de TRBC1 expressie te zien zijn (immers gelijke hoeveelheid TRBC1 als TRBC2, analoog aan Kappa en Lambda), maar een T-celpopulatie zal ofwel (soms zwak) of negatief zijn. Bij negatieve TRBC1 moet men zeker zijn dat het geen T-celpopulatie betreft. Inmiddels heeft WHO 2022 de marker overgenomen als geaccepteerde klonaliteitsmarker en is daarnaast mede op grond van literatuur en ervaring bij NVC-leden besloten TRBC1 (of kit) als verplichte marker op te nemen.

Het minimale panel voor screening naar T-CLPD: CD45, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD56, TCR-GD , T C R Bk. Hierbij kan geen goede subclassificatie uitgevoerd worden, dit zal moeten worden uitgevoerd door een laboratorium met uitgebreide ervaring met leukemische T-cellymfomen. Voor laboratoria die uitgebreidere typering uitvoeren en willen subclassificeren zijn de volgende markers verplicht: cTCL1, CD25, CD26, CD57 en daarnaast CD10, CD30 en CD279 (PD1) sterk aanbevolen met oog op zeldzame leukemische presentatie van AITL en ALCL en CD16, CD94, CD158a/b/e/ bij verdenking op rijpe NK-cel maligniteiten.

T-prolymfocyttaire leukemie (T-PLL)

Kenmerkend immuunfenotype: CD4+, sCD3 verzwakt, CD7++, cTCL1+

In verhouding tot andere T-CLPD beperkte afwijkende expressie van pan T-cel markers, waarbij verzwakte expressie van sCD3 en versterkte expressie van CD7 het meest frequent zijn. 60% is CD4+/CD8-, 25% is CD4+/CD8+ en 15% CD4-/CD8+. CD4+/CD8+ past bij corticale T-ALL/T-LBL, maar wordt bij andere T-CLPD vrijwel niet gezien. De meest specifieke immuunfenotypische afwijking is (over)expressie van cTCL1. De morfologie met kleine tot middelgrote lymfocyten met typisch een opvallende nucleolus en eventuele cytoplasmatische blebs kan behulpzaam zijn.

T-cel Large Granular Lymphocytic leukemie (T-LGL)

Kenmerkend immuunfenotype: CD8+, CD57+ CD5 of CD7 dim

T-LGL leukemie is zeldzaam. T-cellen met een cytotoxisch T-cel profiel: CD2+ CD8+, CD57+ met meest frequent verlies van CD5 of CD7 of dim expressie van CD8. Zeldzame varianten zijn CD4+/CD8- of brengen TCR-GD tot expressie i.p.v. TCR-AB. Homogene expressie van CD11c, CD16 en/of CD94 kan helpen in het onderscheid met reactieve T-LGL populaties (heterogene expressie). N.B. CD57 wordt vaak als T-LGL-definiërende marker gebruikt, maar deze marker hoeft niet positief te zijn in 100% van de afwijkende populatie. N.B. met de komst van TRBC1 worden veel kleine (oligo)klonale T-LGL kloontjes gevonden. Bij kleine klonen (<2x10⁹/L klonale T-cellen) zonder persisterende cytopenieën dient men terughoudend te zijn; mogelijk betreffen dit reactieve/secundaire niet-maligne klonen van onbekende significantie (TCUS, T-cell clonality of undetermined significance)⁴. Een internationale richtlijn is in de maak; zodra deze verschijnt zal worden gekeken of er meer duidelijkheid en richting gegeven kan worden.

⁴ T-cell clones of uncertain significance are highly prevalent and show close resemblance to T-cell large granular lymphocytic leukemia. Implications for laboratory diagnostics - Mod Pathol. 2020 Oct;33(10):2046-2057

NK-cel Large Granular Lymphocytic leukemie leukemie (NK-LGL)

Kenmerkend immuunfenotype: sCD3-, CD56+, CD4-/CD8-, CD2+, CD5-, CD7+, CD11c+, CD16+, CD57+, CD94+.

CD2 en CD7 kunnen verzwakt of negatief zijn, m.n. bij de agressieve variant, in welk geval CD57 vaak negatief is. Bij gebrek aan TCR is aantonen van klonaliteit lastig, aanwijzingen voor een klonale afwijking zijn persisterende (>6 maanden) NK-cel lymfocytose van $>2 \times 10^9/L$ met uniform sterke expressie van CD16 en/of CD94 en restrictie van KIR-receptoren (CD158a/b/e).

Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL)

Kenmerkend immuunfenotype: CD4+, CD25+, CD7-

Deze entiteit is zeer zeldzaam. De meerderheid van casus zijn CD2+, CD4+, CD5+, CD7-. De meest typerende marker is CD25 die in vrijwel alle gevallen homogeen positief is. De morfologie met typische 'flower cells' kan behulpzaam zijn, waarbij de grote afwijkende cellen moeilijk te onderscheiden van ALK-/ + grootcellige anaplastische T-cellymfomen, die naast CD30 ook CD25 tot expressie kunnen brengen.

Mycosis Fungoides (MF)/ Sézary Syndroom (SS)

Kenmerkend immuunfenotype: CD4+, CD7-, CD26-

MF en SS zijn twee verschillende ziektes, maar met sterk overlappende morfologie en immuunfenotypes. Het meest typerende fenotype is CD7-/CD26-, maar CD7+/CD26- en CD7-/CD26+ populaties komen ook frequent voor en populaties in het bloed kunnen qua fenotype verschillen van de fenotypes in de huid. Ook afwijkende expressie van CD2, CD3, CD4 en in mindere mate CD5, komt frequent voor. CD279 (PD1) komt vaak tot overexpressie en ook CD30 kan positief zijn, zij het minder frequent. Het bepalen van het absolute aantal atypische cellen is volgens de laatste richtlijn morfologie met middelgrote lymfocyten met typische cerebriforme kernen kan behulpzaam zijn (indien aanwezig). Voor SS geldt: $>1 \times 10^9/L$ SS-cellen en/of CD4/CD8-ratio >10 en/of $>40\%$ CD4+CD7- T-cellen en/of $>30\%$ CD4+/CD26- T-cellen binnen de lymfocyten.

Overige T-cellymfomen

De overige T-cellymfomen worden hier buiten beschouwing gelaten. Bij CD30-positiviteit moet gedacht worden aan CD30+ cutane T-cellymfomen en ALK+/- grootcellige anaplastische lymfomen. Deze laatste groep heeft vaak sterk afwijkende expressie van pan T-celmarkers en hoge FSC en SSC.