

Citopatološka diagnostika limfomov iz vzorcev bezgavk

Veronika Kloboves Prevodnik

Povzetek

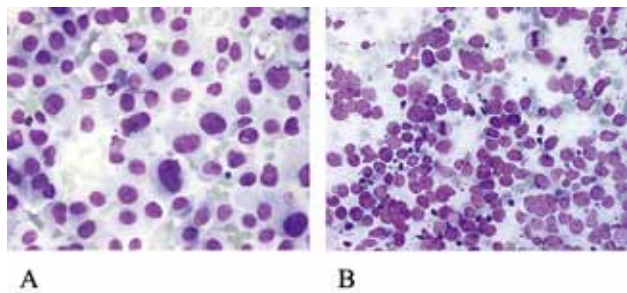
S citopatološko preiskavo lahko hitro, poceni in zanesljivo diagnosticiramo bolezi bezgavk. Pogosto lahko že z mikroskopskim pregledom ugotovimo, ali gre za reaktivni limfadenitis, vnetje, zasevek ali limfom. Kadar to ni mogoče, si pomagamo z dodatnimi imunocitokemičnimi preiskavami in imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom. V citopatološki diagnostiki limfomov uporabljamo predvsem imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom, ker nam omogoča, da zanesljivo ločimo med reaktivnim limfadenitisom in limfomom. Hkrati pa nam v večini primerov pomaga klasificirati limfom.

Uvod

Povečane bezgavke so znak različnih bolezi, najpogosteje reaktivnih limfocitnih proliferacij, ki so posledica aktivacije humoralnega in celičnega imunskega sistema, vnetij ali malignomov. Z aspiracijsko biopsijo s tanko iglo (ABTI) lahko v večini primerov hitro, poceni in zanesljivo ločimo reaktivne limfocitne proliferacije in vnetja od malignomov. V letu 2009 smo na Oddelku za citopatologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani pregledali 8949 vzorcev ABTI, od tega je bilo kar 2292 (26 %) vzorcev bezgavk. Citološka diagnoza je bila reaktivna limfocitna proliferacija ali reaktivni limfadenitis v 939 (41 %) primerih, sumljivo za limfom ali zasevek v 79 (3 %), zasevek karcinoma v 498 (22 %), zasevek melanoma v 68 (3 %) in limfom v 379 (17 %). V 329 (15 %) primerih v vzorcu ABTI bezgavke ni bilo zadosti celic za diagnozo ali pa z ABTI bezgavke nismo zadeli.

Uporaba imunofenotipskih analiz v citopatologiji

Vzorce ABTI najprej pogledamo s svetlobnim mikroskopom. Pogosto že z mikroskopskim pregledom ugotovimo, ali je bezgavka povečana zaradi reaktivnega limfadenitisa, vnetja, zasevka ali limfoma (slika 1).

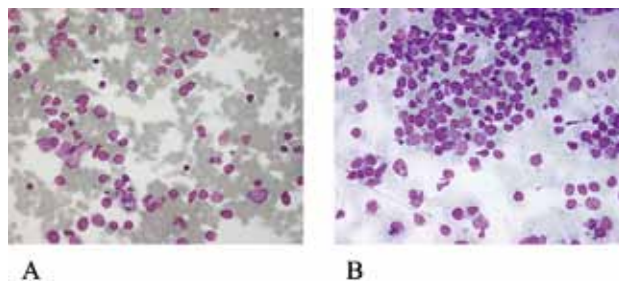


Slika 1. A: Zasevek karcinoma. B: Difuzni velikocelični limfom B.

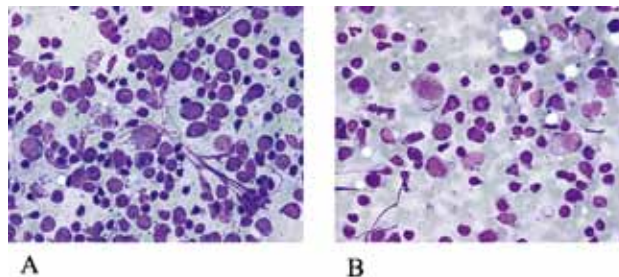
Ker pa so si malignomi različnih nozoloških entitet lahko morfološko zelo podobni in so lahko podobni tudi reaktivno

spremenjeni bezgavki, ni mogoče vselej podati dokončne diagnoze le na podlagi mikroskopskega pregleda. Tedaj uporabljamo sodobne imunofenotipske analize. Z imunofenotipskimi analizami opredelimo antigenske lastnosti ali imunofenotip celic v vzorcu ABTI. Na podlagi morfoloških in imunofenotipskih značilnosti lahko v večini primerov:

1. razlikujemo med različnimi malignomi: karcinomi, melanomom, limfomi, levkemijami in sarkomi (slika 2),
2. razlikujemo med reaktivnim limfadenitisom in limfomom (slika 3),
3. klasificiramo limfome (slika 4).

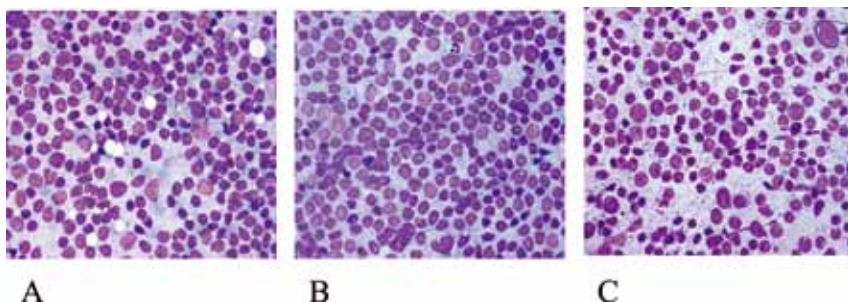


Slika 2. Karcinomske, melanomske, limfomske in sarkomske tumorske celice so si lahko tako podobne, da jih s pregledom s svetlobnim mikroskopom ni mogoče razlikovati. A: Zasevek nevroendokrinega karcinoma. B: Difuzni velikocelični limfom B.



Slika 3. Razlikovanje med reaktivnim limfadenitisom in limfomom le s pregledom vzorca s svetlobnim mikroskopom velikokrat ni mogoče. A: Reaktivni limfadenitis. B: Difuzni velikocelični limfom B.

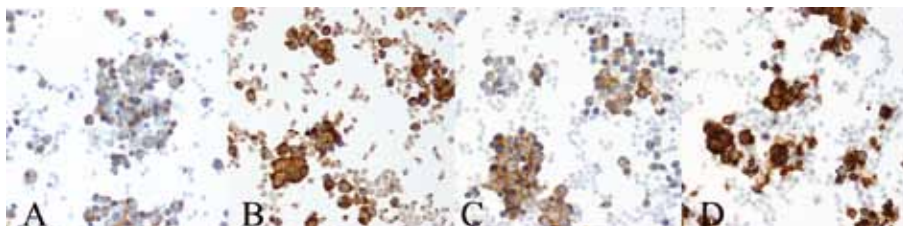
Imunofenotipske analize lahko naredimo na 2 načina, z imunocitokemičnim barvanjem in z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom. Z imunocitokemičnim barvanjem prikazujemo prisotnost antigena v celicah na objektnem steklu, pri čemer se celice, ki vsebujejo antigen, obarvajo rjavo, rdeče ali modro. Barva je odvisna od vrste kromogena, ki ga pri imunocitokemičnem barvanju uporabljamo za prikaz vezave specifičnega protitelesa in antigena v celici. Imunocitokemično barvanje uporabljamo predvsem za razlikovanje



Slika 4. Klasificiranje limfomov brez uporabe dodatnih imunofenotipskih analiz v večini primerov ni mogoče. A: Limfom marginalne cone. B: Limfom plaščnih limfocitov. C: Folikularni limfom.

med različnimi malignomi: melanomom, karcinomi, sarkomom, limfomom in levkemijami. V citopatološki diagnostiki limfomov uporabljamo predvsem imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom, s katero preštujemo celice, ki izražajo enega ali več antigenov. Na podlagi naših raziskav in podatkov v literaturi smo ugotovili, da je za diagnosticiranje limfomov bolj senzitivna in specifična kot imunocitokemično barvanje (1–3). Zato imunocitokemično barvanje v diagnostiki limfomov uporabljamo le v posebnih primerih:

1. za razlikovanje med limfomi in drugimi malignomi (slika 5),



Slika 5. Z imunocitokemičnim barvanjem za prikaz različnih citokeratinov in neuroendokrinih antigenov zanesljivo ločimo med neuroendokrinim karcinomom in limfomom. A–D: Pozitivna imunocitokemična reakcija na pancitokeratin (A), citokeratin 20 (B), sinaptofizin (C) in CD56 (D) v zasevku neuroendokrinnega karcinoma.

2. za diagnozo Hodgkinovega limfoma in analplastičnega velikoceličnega limfoma ALK⁺ in ALK⁻,
3. za določanje jedrnih antigenov, ki jih z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom ne moremo zanesljivo dokazati: ciklina D1 in MIB-1.

Imunofenotipizacija s pretočnim citometrom

Za imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom se na podlagi mikroskopskega pregleda vzorca ABTI bezgavke odloči citopatolog. Imunofenotipizacija je indicirana vedno, kadar je mikroskopska, morfološka slika sumljiva za limfom ali pa kadar suma, da gre za limfom, ne moremo potrditi z mikroskopskim pregledom vzorca klinično sumljive bezgavke.

Na Onkološkem inštitutu v Ljubljani smo začeli uporabljati imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom leta 1998. Kako pomembna je ta preiskava za postavitve pravilne diagnoze limfoma, nam pove podatek, da se je z uporabo imunofenotipizacije od 1998 do 2009 senzitivnost citopatološke

diagnostike limfomov z 0,92 povečala na 0,99. Specifičnost metode se ni bistveno spremenila in se je v tem obdobju gibala med 0,91 in 0,95 (4).

Imunofenotipizacija s pretočnim citometrom je zahteven in sorazmerno drag postopek. Za zanesljivo izvedbo potrebujemo sodoben večbarvni pretočni citometer ter posebej usposobljene in izkušene laboratorijske delavce (slika 6).

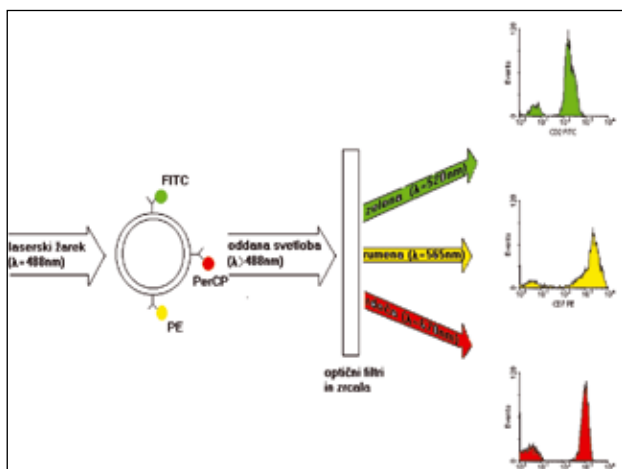
V rutinski citološki diagnostiki limfomov še vedno največ uporabljamo 4-barvne pretočno citometrične meritve, kar pomeni, da z aparatom na 1 celici opredelimo 4 različne celične antigene hkrati. Pretočni citometri so zasnovani tako, da na prisotnost celičnih antigenov sklepamo posredno z merjenjem fluorescentne svetlobe, ki jo v aparatu odda fluorokrom, vezan na protiteleso, s katerim smo želeli v celici prikazati prisotnost določenega antigena. Za označevanje celičnih antigenov v pretočni citometriji največkrat uporabljamo direktno fluorescentno reakcijo (5).

Princip 3-barvnih pretočnih citometričnih meritev

Na sliki 7 je prikazan princip 3-barvnih pretočnih citometričnih meritev s primerom, kjer na limfocitih v vzorcu ABTI bezgavke prikažemo prisotnost površinskih antigenov CD2, CD7 in CD3, ki so značilni za limfocite T. Limfocite najprej označimo s specifičnimi protitelesi, ki se vežejo z antigeni CD2, CD7 in CD3 na površini limfocitov T. Protitelesa morajo biti označena z različnimi fluorescentnimi molekulami. V našem primeru je protiteleso, ki se veže na antigen CD2, označeno s fluorescein izotiocinatom (FITC), protiteleso, ki se veže na CD7, s fikoeritrinom (PE) in protiteleso, ki se veže na CD3, s peridinin klorofil proteinom a (PerCP). Za vse 3 fluorescentne molekule je značilno, da fluorescirajo, če jih presvetlimo s svetlobo točno določene valovne dolžine. Vzorec ABTI



Slika 6. Pretočni citometer BD FACS Canto II, ki ga uporabljamo na Oddelku za citopatologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani.



Slika 7. Princip 3-barvnih pretočnih citometričnih meritev.

bezgavke spustimo skozi pretočni citometer, kjer se vsaka celica najprej presvetli z lasersko svetlobo valovne dolžine 488 nm, da pride do fluorescence. Fluorescirajo le tiste celice v vzorcu, ki so označene s protitelesi proti antigenom CD2, CD7 in CD3, na katera so vezane različne fluorescentne molekule. Vsaka odda kvant svetlobe s točno določeno valovno dolžino. Molekula FITC odda zeleno svetlobo, PE rumeno in PerCP rdečo. S pomočjo optičnih filtrov in zrcal, ki so v pretočnem citometru, oddano svetlobo, ki je nastala zaradi fluorescence, usmerimo na detektorje monokromatske svetlobe. Detektorji pretvorijo svetlobne signale v električne, ki se v računalniškem delu pretočnega citometra digitalizirajo in obdelajo tako, da prisotnost ali odsotnost antigenov CD2, CD7 in CD3 na limfocitih v vzorcu ABTI bezgavke prikazemo grafično s histogrami. Večji vrh na histogramih prikazuje delež limfocitov T, za katere je značilno, da imajo na celični membrani antigene CD2, CD7 in CD3. Manjši vrh v histogramih pa prikazuje limfocite B, ki teh antigenov nimajo (5).

Priprava vzorcev za imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom

Za imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom potrebujemo suspenzijo celic, ki jo napravimo ob odvzemu vzorca z ABTI, kadar sumimo, da gre za limfom. Suspenzijo napravimo tako, da del vzorca izbrizgamo v 1,5 ml celičnega medija, ki je po sestavi podoben celični kulturi. Celice v celičnem mediju več dni ohranijo svoje morfološke in antigenske lastnosti, zato jih po potrebi lahko uporabimo za dodatne imunofenotipske in tudi molekularne analize. Minimalno število celic, ki jih potrebujemo za potrditev diagnoze limfoma, je 0,5 do 1,0 x 10⁶ v 1,5 ml celične suspenzije, za klasifikacijo limfomov pa več kot 1,0 x 10⁶. Zato pred pripravo vzorca za imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom najprej preštujemo število celic v vzorcu (6).

Na podlagi orientacijskega mikroskopskega pregleda vzorca ABTI bezgavke nato izberemo celične antigene, ki jih bomo skušali dokazati z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom. Če sumimo, da gre za limfom B, moramo dokazati prisotnost ali odsotnost najmanj naslednjih antigenov: CD45, CD19, CD20, CD3, kapa, lambda, CD10, FMC7, CD23, CD5, CD52, CD11c in CD38, če sumimo, da gre za limfom T, pa CD45, CD56+16, CD3, CD19, kapa, lambda, CD10, CD4, CD8, CD2, CD7 in CD5. Ker nekaterih limfomov ne

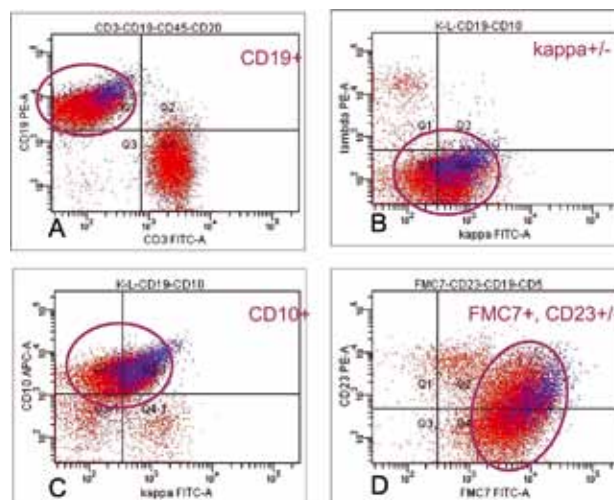
moremo klasificirati le na podlagi zgoraj navedenih antigenov, lahko dokažemo dodatne antigene, ki so značilni za posamezni tip limfoma, npr. TdT za limfoblastni limfom/levkemijo, CD138 in CD56 za plazmocitom, CD138 za plazmablastno varianto difuznega velikoceličnega limfoma B, in CD103 za dlakastocelično levkemijo (7).

Vzorci za meritve s pretočnim citometrom pripravimo po modificiranem protokolu, ki smo ga razvili na Oddelku za citopatologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani (6). Pripravljene vzorce izmerimo s pretočnim citometrom BD FACS Canto II, rezultate meritev analiziramo in prikazemo z računalniškim programom FACSDiva.

Antigenske lastnosti limfomskih in reaktivnih limfatičnih celic, pomembne za zanesljivo diagnosticiranje limfoma

Za potrditev suma, da gre za limfom, in za klasificiranje limfoma moramo z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom opredeliti:

1. celično linijo limfomskih celic (celice B, T ali NK),
2. klonalnost celic B,
3. aberantni fenotip celic T,
4. antigenske lastnosti, ki so značilne za posamezen tip limfoma (slika 8).



Slika 8. A–D: Z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom smo ugotovili, da so limfatične celice v vzorcu celice B, ker so CD19 pozitivne (A), monoklonalne, ker so šibko kapa pozitivne (B) in imajo fenotip (CD10+, FMC7+, CD23+/-), ki je značilen za folikularni limfom (C in D).

Zanesljivost citopatološke diagnostike limfomov, podprte z rezultati imunofenotipizacije s pretočnim citometrom

Z uporabo 4-barvne imunofenotipizacije s pretočnim citometrom lahko postavimo citopatološko diagnozo limfoma v manj kot 4 urah. Kakšna je zanesljivost take diagnoze, smo preverili s prospektivno raziskavo, ki smo jo opravili, ko smo v rutinsko citološko diagnostiko limfomov uvajali 4-barvno imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom. V raziskavo smo vključili 144 bolnikov z limfadenopatijo. Rezultate smo primerjali z rezultati histološke preiskave, če ta ni bila narejena, pa s kliničnim potekom bolezni. Ugotovili smo, da je bila citološka diagnoza limfoma pravilna v 96,5 % primerov. Iz tabele 1 je razvidno, da je bila citopatološka diagnoza v 4 primerih od

114 (2,8 %) napačno sumljiva in v 1 primeru (0,7 %) napačno negativna. Napačno sumljivo diagnozo folikularnega limfoma smo postavili, ker lahko monoklonalnost celic B izjemoma dokažemo tudi pri reaktivnem limfadenitisu. Prav tako smo napačno sumljivo diagnozo za limfom T postavili zato, ker lahko tudi aberantni fenotip najdemo pri posameznih primerih reaktivnega limfadenitisa. Napačno negativno diagnozo smo postavili, ker smo z mikroskopskim pregledom celičnega vzorca spregledali posamezne, slabo vidne neoplastične celice.

Tabela 1. Rezultati prospektivne raziskave, s katero smo preverili pravilnost citopatološke diagnoze limfoma.

Citopatološka diagnoza	Število bolnikov		Komentar*
	N	%	
Pravilno pozitivna	90	62,5	
Pravilno sumljiva	4	2,8	Histološka diagnoza: limfom marginalne cone (N = 2), folikularni limfom (N = 1), periferni limfom T (N = 1)
Pravilno negativna	45	31,2	
Napačno pozitivna	0	0	
Napačno sumljiva	4	2,8	Citopatološka diagnoza: sumljivo za folikularni limfom (N = 2), sumljivo za limfom T (N = 2)
Napačno negativna	1	0,7	Histološka diagnoza: Hodgkinov limfom (N = 1)
Vse diagnoze	144	100	

N – število primerov

* Pri primerih, kjer je bila citopatološka diagnoza pravilno sumljiva ali napačno negativna, so navedene histološke diagnoze. Pri primerih, kjer je bila diagnoza napačno sumljiva, pa je v komentarju navedena citopatološka diagnoza, ki s histološko preiskavo ni bila potrjena.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo izračunali, da je senzitivnost citopatološke diagnoze limfoma, ki temelji na kombinaciji mikroskopske, morfološke analize vzorca in 4-barvne imunofenotipizacije s pretočnim citometrom, 0,99, specifičnost 0,92, pozitivna napovedna vrednost 0,96 in negativna napovedna vrednost 0,98.

Dodatne možnosti imunofenotipizacije s pretočnim citometrom

Poleg zanesljive diagnoze je za načrtovanje zdravljenja limfomov vse pomembnejše določanje napovednih dejavnikov poteka bolezni in odziva na zdravljenje. Z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom določamo antigen CD38 in protein ZAP-70, ki sta napovedna dejavnika neugodnega poteka bolezni pri bolnikih s kronično limfocitno levkemijo, ter izražanje antigenov CD20 in CD52, ki sta pomembna zaradi zdravljenja z biološkimi zdravili, rituksimabom in alemtuzumabom (8–10).

Omejitve imunofenotipizacije s pretočnim citometrom

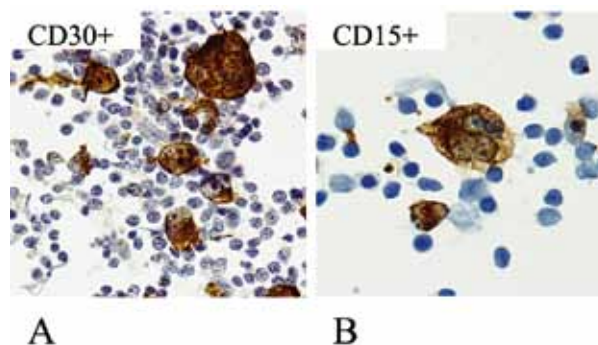
Čprav lahko z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom hitro in zanesljivo diagnosticiramo limfom pri večini bolnikov z limfadenopatijo, pri katerih sumimo, da gre za na limfom, pa v redkih primerih zaradi omejitev, ki jih ima metoda, to ni mogoče. Z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom si

v citopatološki diagnostiki limfomov ne moremo pomagati, kadar:

1. vzorci ABTI bezgavk vsebujejo zelo malo celic,
2. so maloštevilne limfomske celice pomešane s številnimi reaktivnimi celicami (Hodgkinov limfom, anaplastični velikocelični limfom ALK⁺ in ALK⁻, velikocelični limfom B bogat z limfociti T),
3. so limfomske celice zelo degenerirane,
4. klonalnosti B celic ne moremo dokazati,
5. sumimo, da gre za limfom T.

Imunofenotipizacija s pretočnim citometrom je tehnično izvedljiva le, če je v vzorcu ABTI bezgavke zadosti celic. Po naših izkušnjah je pri uporabi 4-barvnih pretočnih citometričnih meritev optimalno število celic za potrditev in klasifikacijo limfoma 2×10^9 . Žal pa imamo tako število celic le pri približno 61 % vzorcev ABTI (6). V vzorcih ABTI bezgavk, ki jih odvzamejo citopatologi, je povprečno 3×10^9 celic, v vzorcih, ki jih odvzamejo drugi specialisti, pa manj kot 1×10^9 . Število celic v vzorcu je najbolj odvisno od usposobljenosti in izkušenosti zdravnika, ki izvaja ABTI, in manj od patološke spremembe, ki jo punktiramo. Ker je imunofenotipizacija s pretočnim citometrom bistvenega pomena za zanesljivo citopatološko diagnozo limfoma, smo si prizadevali zmanjšati število celic, ki jih potrebujemo za imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom. V našem laboratoriju smo razvili poseben protokol priprave vzorcev za imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom, ki nam omogoča, da diagnozo limfoma postavimo tudi iz vzorcev, ki vsebujejo le 500.000 celic. Veliko si obetamo tudi od 6- in 8-barvnih pretočnih citometričnih meritev, ki nam bodo omogočile zanesljivo diagnozo limfoma iz še manjšega števila celic.

Z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom si v diagnostiki limfomov ne moremo pomagati, kadar so maloštevilne limfomske celice pomešane s številnimi reaktivnimi celicami, kot je to značilno za velikocelični limfom B bogat z limfociti T, Hodgkinov limfom in anaplastični velikocelični limfom ALK⁺ in ALK⁻. V teh primerih si pomagamo s posebnim načinom merjenja na pretočnem citometru ali z uporabo imunocitokemičnih reakcij (slika 9).



Slika 9. Imunofenotipa neoplastičnih celic Hodgkinovega limfoma z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom ne moremo opredeliti, zato uporabljamo imunocitokemične reakcije, s katerimi lahko zanesljivo opredelimo imunofenotip posameznih tumorskih celic. Rezultat imunocitokemičnega barvanja odčitamo s pregledom pobarvanih preparatov svetlobnim mikroskopom. Neoplastične celice Hodgkinovega limfoma, ki imajo antigen CD30 (A) ali CD15 (B), so se pobarvale rjavo.

Kadar so celice v vzorcih ABTI bezgavke degenerirane ali celo nekrotične, imunofenotipizacija s pretočnim citometrom ni indicirana, ker se celice med pripravo vzorcev lizirajo. Prav tako je po podatkih iz literature imunofenotipizacija s pretočnim citometrom difuznih velikoceličnih limfomov B pogosto neuspešna, ker se limfomske celice med izvajanjem metode izgubijo (11). Z uporabo posebnega protokola, ki smo ga v našem laboratoriju razvili za imunofenotipizacijo citoloških vzorcev (6), tega problema nimamo več.

Imunofenotipizacija s pretočnim citometrom nam ni v pomoč tudi v maloštevilnih primerih limfomov B, če klonalnosti celic B ne moremo dokazati. Klonalnost celic B je izjemnega pomena za razlikovanje med limfomom B in reaktivnim limfadenitisom. Limfomi B so praviloma monoklonalni, reaktivni limfadenitisi pa poliklonalni (12). Ker so v posameznih primerih reaktivnih limfadenitisev limfociti B lahko monoklonalni, moramo pri postavitvi diagnoze limfoma poleg klonalnosti vedno upoštevati tudi klinično sliko ter morfološke in druge antigenske značilnosti limfatičnih celic. Klonalnost celic B lahko opredelimo z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom ali z metodo reakcije verižne polimerizacije (PCR). Naše izkušnje in tudi podatki v literaturi kažejo, da je imunofenotipizacija s pretočnim citometrom za določanje klonalnosti celic B občutljivejša od metode PCR (13), zato v rutinski diagnostiki limfomov B uporabljamo prvo preiskavo. Razlogi, zakaj z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom ne moremo dokazati klonalnosti celic B, so različni. Tega ne moremo storiti, kadar je bezgavka le delno prerasla z limfomom in imamo zato v vzorcu tako limfomske celice kot tudi reaktivne limfatične celice, kadar lahke verige na limfomskih celicah niso izražene ali kadar zaradi nespecifične vezave protiteles proti kapa in lambda lahkim verigam dobimo napačen rezultat, ker so celice B pozitivne za obe lahki verigi. V teh primerih si pri postavitvi diagnoze pomagamo z določanjem izražanja proteina bcl-2, ki je pri številnih limfomih prekomerno izražen, pri reaktivnih limfocitnih proliferacijah pa ne (14), ali pa z določanjem klonalnosti celic B z metodo PCR (15).

Prav tako nam imunofenotipizacija s pretočnim citometrom ni v veliko pomoč pri diagnosticiranju limfomov T. Citopatološka diagnostika limfomov T je nasploh zelo zahtevna, saj je mikroskopska slika limfoma T velikokrat zelo podobna reaktivnemu limfadenitisu. Poleg tega z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom klonalnosti celic T ne moremo določati, ker nimamo ustreznih protiteles. Zato si pomagamo z določanjem aberantnega fenotipa. O aberantnem fenotipu govorimo, kadar antigeni, ki so značilni za normalne limfocite T na neoplastičnih celicah limfoma T, niso izraženi ali pa so izraženi v napačnih kombinacijah. Določanje aberantnega fenotipa z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom je po naših izkušnjah pogosto nezanesljivo, saj je aberantni fenotip lahko izražen le na manjšem delu limfomskih celic ali pa celo na neneoplastičnih limfocitih T. Zato si v zadnjem času uspešno pomagamo z določanjem klonalnosti celic T z metodo PCR (15).

Sklep

Uporaba imunofenotipizacije s pretočnim citometrom poveča občutljivost citološke preiskave vzorcev ABTI bezgavk, ki so sumljive za limfom, in izboljša zanesljivost klasificiranja limfomov. Interpretacija meritev je v številnih primerih zapletena in zahteva precejšnjo izkušnost citopatologa.

Viri

1. Simsir A, Fetsch P, Stetler-Stevenson, Abati A. Immunophenotypic analysis of non-Hodgkin lymphomas in cytologic specimens: a correlative study of immunocytochemical and flow cytometric techniques. *Diagnostic Cytopathology* 1999; 20: 278–84.
2. Kloboves Prevodnik V, Pogačnik A, Us Krašovec M, Petrič J, Ihan A, Golouh R, Srebotnik Kirbiš I. Can ancillary methods improve the reliability of fine needle aspiration biopsy (FNAB) in preoperative diagnosis of non-Hodgkin lymphomas (NHL)? 10th meeting of European association for haematopathology, London 2000. Abstracts, P-10.
3. Dong HY, Harris NL, Preffer FI, Pitman MB. Fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis and classification of primary and recurrent lymphoma; A retrospective analysis of the utility of cytomorphology and flow cytometry. *Mod Pathol* 2001; 14: 472–81.
4. Kloboves Prevodnik V. Flow cytometric immunophenotyping in cytological diagnostics of lymphomas: can the type of flow cytometric protocol influence the sensitivity and specificity of cytological diagnostics of lymphomas? XXXIII European Congress of Cytology, October 14th-17th, 2007, Madrid 2007.
5. Ormerod MG. *Flow cytometry. A practical approach*. New York: Oxford University Press, 2000.
6. Kloboves Prevodnik V, Strojjan Fležar M, Pohar Marinšek Ž. Improved method for flow cytometric immunophenotyping of FNAB samples. XXII. Congress of International Society for Analytical cytology, Mountprllier, France 2004. Abstracts, P122348.
7. Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. *WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. In World Health Organization Classification of Tumors. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008.
8. Cheson BD, Leonard JP. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2008; 359(6): 613–26. Review.
9. Boyd K, Dearden CE. Alemtuzumab in the treatment of chronic lymphocytic lymphoma. *Expert Rev Anticancer* 2008; 8(4): 525–33. Review.
10. Jiang L, Yuan CM, Hubacheck J, Janik JE, Wilson W, Morris JC, Jasper GA, Stetler-Stevenson M. Variable CD52 expression in mature T cell and NK cell malignancies: implications for alemtuzumab therapy. *Br J Haematol*. 2009; 145(2): 173–9.
11. Bertram HC, Check IJ, Milano MA. Immunophenotyping large B-cell lymphomas. Flow cytometric pitfalls and pathologic correlation. *Am J Clin Pathol*. 2001; 116(2): 191–203.
12. Fukushima PI, Nguyen PK, O'Grady P, Stetler-Stevenson M. Flow cytometric analysis of kappa and lambda light chain expression in evaluation of specimens for B-cell neoplasia. *Cytometry* 1996; 26(4): 243–52.
13. Kloboves Prevodnik V. The diagnosis of malignant lymphomas from cell samples: combined morphological and flow cytometric analysis. In: Bračko M, Jančar J, Zidar A. An update of diagnostic approach to malignant lymphomas. Proceedings of XXXIII. Memorial meeting for professor Janez Plečnik with international participation. Ljubljana: Institute of Pathology, Faculty of Medicine University of Ljubljana Institute of Oncology Ljubljana, 2002.
14. Laane E, Tani E, Björklund E, ElMBERGER G, Everaus H, Skoog L, Porwit-Macdonald A. Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-Hodgkin's lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom* 2005; 64(1): 34–42.
15. Cerkovnik P, Kokovič I, Kloboves Prevodnik V, Novaković S. Določanje klonalnosti limfoidnih populacij-uvredba nove metode in primerjava z dosedanjo. *Onkologija* 2009; 2: 133–6.