

3 Diagnostische Methoden in der Hämatologie

K.-A. Kreuzer

Eine exakte hämatologische Diagnostik ist Voraussetzung für jede Therapieentscheidung. Ferner liefern viele diagnostische Parameter wertvolle Informationen für die Prognose. Prinzipiell stehen als Methoden zur Verfügung: Zytomorphologie, Durchflusszytometrie, Zytogenetik, Molekulargenetik, Histopathologie und die klinische Chemie. Wichtig ist, dass alle vorgenannten Methoden komplementär zueinander sind. Das bedeutet, dass man sehr häufig mehrere Techniken anwenden muss, um zu einem diagnostischen Ergebnis mit hinreichender Sicherheit zu gelangen. Bildgebende Verfahren spielen in der Regel nur für die Ausbreitungsdiagnostik hämatologischer Erkrankungen eine Rolle.

3.1 Blutbild und Differenzialblutbild

3.1.1 Blutbild

► **Grundparameter.** Unter dem Blutbild versteht man gemeinhin die Bestimmung der zellulären Blutparameter. Neben der reinen Zellzahl von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten zählen hierzu noch der Hämoglobingehalt des Blutes sowie der Hämatokrit-Wert, der Aufschluss über das Verhältnis zellulärer zu nicht zellulären Blutbestandteilen gibt. Aus den vorgenannten Parameter lassen sich zudem die Erythrozytenindizes errechnen: Mean corpuscular Volume (MCV), Mean corpuscular Hemoglobin (MCH) und Mean corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC). Im weiteren Sinne zählen auch die Retikulozyten zum Blutbild. Darüber hinaus existieren noch zahlreiche zusätzliche Mess- und Rechenparameter, wie z. B. die Erythrozytenverteilungsbreite (RDW) oder das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV), welche je nach Messmethode bestimmt werden können (► Tab. 3.1).

► **Blutbildautomaten.** Die Bestimmung des Blutbildes erfolgt heutzutage praktisch immer in einem Hämatologie-Automaten. Für die vorgenannten Grundparameter ist dies eine probate Methode, es gilt jedoch auch Einschränkungen zu beachten.

Ein nicht seltenes Phänomen ist z. B. die sog. Pseudothrombozytopenie, welche dadurch entsteht, dass Thrombozyten in Anwesenheit des Antikoagulans EDTA aggregieren. Die entstehenden Aggregate werden fälschlicherweise als Leukozyten klassifiziert, während die Thrombozytenzahl scheinbar erniedrigt ist. Durch eine mikroskopische Kontrolle oder eine Kontrollmessung mit einem alternativen Antikoagulans kann dieser Fehler aufgedeckt werden.

Tab. 3.1 Parameter und exemplarische Normbereiche des Blutbildes.

Parameter	Normbereich
Leukozyten	4,5–11,5 G/l
Erythrozyten	4,0–5,5 G/l
Hämoglobin	12,0–16,0 g/dl
Hämatokrit	35–45 %
Mean corpuscular Volume (MCV)	80–95 fl
Mean corpuscular Hemoglobin (MCH)	30–35 pg
Mean corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC)	30–40 g/dl
Thrombozyten	150–400 G/l
Retikulozyten	0,5–2,0 %
Erythrozytenverteilungsbreite (RDW)	11,5–14,5 %
Mittleres Thrombozytenvolumen (MPV)	7,0–11,0 fl

Ein weiterer Schwachpunkt von Hämatologie-Automaten ist die Analyse der Leukozytenarten. Im Allgemeinen kann festgestellt werden, dass die Klassifikation normaler Leukozyten bei entsprechend zertifizierten Geräten meist zuverlässig ist. Bei unphysiologischen Zuständen, z. B. Normoblastämie, zirkulierenden Plasmazellen, pathologischer Linksverschiebung der Granulozyten, aberranten Lymphozyten oder Vorkommen von Riesenthrombozyten können jedoch völlig falsche Messergebnisse entstehen. Bei entsprechender Verdachtslage muss daher immer zusätzlich ein mikroskopisches Differenzialblutbild erstellt werden.

Praxistipp

Blutbildautomaten (Hämatozytometer) können unphysiologische Zellarten in der Regel nicht richtig einordnen. Ein mikroskopisches Differenzialblutbild ist daher bei hämatologischen Erkrankungen unverzichtbar.

3.1.2 Differenzialblutbild

► **Zellverteilung.** Wie bereits ausgeführt, unterliegt das maschinelle Differenzialblutbild vielen Fehlerquellen. Es sollte daher nach Möglichkeit eine mikroskopische Kontrolle erfolgen. Üblicherweise werden hierzu Ausstrichpräparate aus Nativblut oder EDTA-Blut angefertigt. Die Färbung erfolgt zumeist als panoptische Färbung nach Pappenheim (Giemsa-Färbung und May-Grünwald-Färbung). Anschließend werden mindestens 100 kernhaltige Zellen klassifiziert. ► Tab. 3.2 gibt einen Überblick über die Verteilung normaler Leukozyten im peripheren Blut.

Tab. 3.2 Differenzialblutbild mit exemplarischen Normbereichen.

Zellen	Normbereich in %
Stabkernige neutrophile Granulozyten	3–5
Segmentkernige neutrophile Granulozyten	55–60
Eosinophile Granulozyten	2–4
Basophile Granulozyten	0–1
Lymphozyten	25–40
Monozyten	3–7

Wichtig ist aber auch zu erkennen, welche Zellen unter physiologischen Umständen nicht in der peripheren Zirkulation vorkommen dürfen. Hierzu zählen alle granulopoetischen Zellen, die unreifer als stabkernige Granulozyten sind (Metamyelozyten, Myelozyten, Promyelozyten und Myeloblasten) sowie Plasmazellen, Erythroblasten und alle nicht hämatopoetischen Zellen. ▶ Abb. 3.1 zeigt einige typische quantitative Veränderungen der Granulozyten im peripheren Blut.

► **Qualitative Zellcharakterisierung.** Neben der Bestimmung der rein quantitativen Zusammensetzung der kernhaltigen Zellen besteht die besondere Herausforderung beim mikroskopischen Differenzialblutbild in der qualitativen Charakterisierung der verschiedenen Zellen. So können Lymphozyten z. B. als kleine reife Zellen, als aktivierte Lymphozyten, als Virozyten, als Sézary-Zellen, als Hairy Cells oder als sog. Large granular Lymphocytes (LGL) usw. imponieren. Außerdem sollte unbedingt auch auf das Erscheinungsbild der nicht kernhaltigen Zellen geachtet werden. Intrazelluläre Einschlüsse, wie Malaria-Plasmodien oder Howell-Jolly-Körperchen, werden von Hämatologie-Automaten nicht erfasst und können nur mikroskopisch gesehen werden. Gelegentlich ist es notwendig, am peripheren Blutausstrich auch zytochemische und andere Färbungen durchzuführen.

Praxistipp

Die mikroskopische Beurteilung von Differenzialblutbildern erfordert Erfahrung. Die deutschsprachigen Fachgesellschaften bieten daher regelmäßig praktische Kurse zu diesem Thema an (Informationen: <http://www.dgho.de>, <http://www.oegho.at>, <http://www.sgh-ssh.ch>). Darüber hinaus existieren zahlreiche Bilddatenbanken zum Selbststudium (Auswahl):

- <http://www.hemato-images.eu>
- <http://www.hematologyatlas.com>
- <http://www.ashimagebank.org>

3.2 Zytomorphologie und Histopathologie

3.2.1 Zytomorphologie

► **Knochenmarkpräparat.** Die Zytomorphologie des Knochenmarks besitzt einen besonderen Stellenwert bei der Diagnostik hämatologischer Erkrankungen. Zum einen ist sie eine schnelle Methode, um die differenzialdiagnostischen Überlegungen in eine bestimmte Richtung zu lenken. Zum anderen ergeben sich aus ihr häufig die Indikationen für aufwendigere und teurere Spezialuntersuchungen. Die Zytomorphologie ist also nicht trotz, sondern wegen der modernen zellulären und genetischen Verfahren wichtiger Ausgangspunkt, um eine inhaltlich sinnvolle und wirtschaftliche Stufendiagnostik durchzuführen.

Die zytomorphologische Untersuchung des Knochenmarks erfolgt üblicherweise an einem panoptisch gefärbten Ausstrich- oder Quetschpräparat. Auch hier ist, nachdem man sich von der Qualität des Materials überzeugt hat, zunächst eine quantitative Differenzierung von mindestens 200 Zellen angezeigt. ▶ Tab. 3.3 zeigt die typische Verteilung von kernhaltigen Zellen im Knochenmark. Darüber hinaus finden sich im Knochenmark auch Retikulumzellen, Mastzellen und Gewebsmakrophagen (Histiozyten).

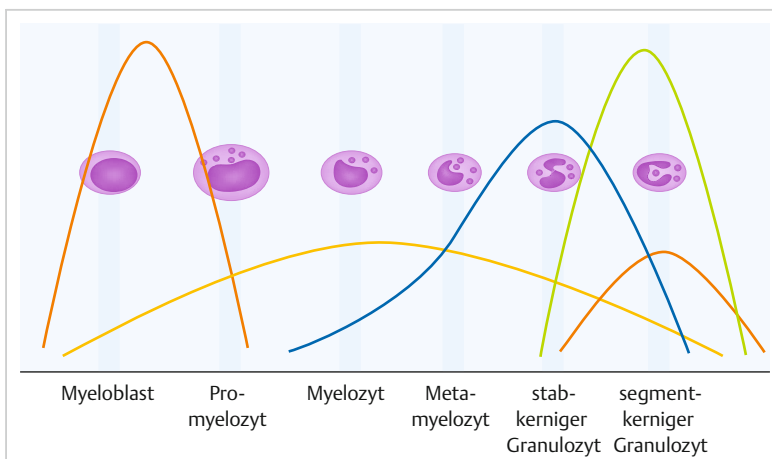


Abb. 3.1 Quantitative Granulozytenverschiebungen im peripheren Blut. Grün: physiologisch, blau: reaktive Linksverschiebung, gelb: pathologische Linksverschiebung, rot: Hiatus leucaemicus.

Tab. 3.3 Myelogramm mit exemplarischen Normbereichen.

Kernhaltige Zellen im Knochenmark	Normbereich in %
Myeloblasten	0–5
Promyelozyten	2–6
Myelozyten	10–30
Metamyelozyten	10–30
Stabkernige neutrophile Granulozyten	15–35
Segmentkernige neutrophile Granulozyten	15–35
Eosinophile Granulozyten	1–5
Basophile Granulozyten	0–1
Lymphozyten	5–20
Monozyten	1–5
Plasmazellen	1–6
Proerythroblasten	1–3
Basophile Erythroblasten	1–3
Polychromatische Erythroblasten	10–20
Orthochromatische Erythroblasten	2–20
Megakaryozyten	0–1

► **Qualitative Zellbeurteilung.** Auch und gerade im Knochenmark muss eine genaue qualitative Würdigung der mikroskopierten Zellen erfolgen. So geben sich myelodysplastische Erkrankungen oftmals ausschließlich durch ihre charakteristischen Reifungsstörungen zu erkennen. Ebenso kann eine Infiltration durch nicht hämatologische Zellen, z. B. Karzinomzellen vorliegen. Auch im Knochenmark können zytochemische Färbungen sehr hilfreich sein. Hierzu zählen insbesondere die Myeloperoxidase-Reaktion (POX), die α -Naphthyl-Esterase-Reaktion (NE), die Saure-Phosphatase-Reaktion (SP), die Periodoschiff-säure-Reaktion (PAS) und die Berliner-Blau-Reaktion.

► **Andere Präparate.** Außer Knochenmark können jedoch auch andere Materialien zytomorphologisch untersucht werden. Hierzu zählen v. a. Punktionsflüssigkeiten (Liquor, Aszites, Pleuraerguss u. a.) sowie Zellaspirate von Lymphknoten.

Praxistipp

Einige Erkrankungen wie die primäre Myelofibrose, die akute lymphatische Leukämie, die Haarzell-Leukämie oder Knochenmarkkarzinosen führen häufig zu einer erfolglosen Knochenmarkaspiration (Punctio sicca). In diesen Fällen kann versucht werden, durch Abrollen eines Biopsiezylinders auf Objektträgern Präparate zu gewinnen, die dennoch eine diagnostische Aussage erlauben.

3.2.2 Histopathologie

Auch die Histopathologie ist von großer Bedeutung für die Diagnose vieler hämatologischer Erkrankungen. Sie bietet im Vergleich zur Zytomorphologie den großen Vorteil, dass am Gewebeschnitt eine Vielzahl von zytochemischen, immunologischen und molekularpathologischen Untersuchungen durchgeführt werden kann. Hierdurch kann häufig eine genaue Gewebs- und Differenzierungszuordnung erfolgen. Aber auch die Gewebsarchitektur, d. h. Zellverteilung, kann wertvolle diagnostische Hinweise geben. Eine weitere Stärke der Histopathologie ist, dass – bei zwar weniger starker Vergrößerung – eine größere Gewebefläche begutachtet werden kann. Dies kann z. B. bei fokalen neoplastischen Infiltrationen von Bedeutung sein. Schließlich hilft die Histopathologie häufig weiter, wenn aufgrund der Erkrankung kein Knochenmarkaspirat gewonnen werden kann (Punctio sicca). Sie ist außerdem das Diagnostikum der Wahl bei allen hämatologischen Krankheiten, die sich primär im lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Milz etc.) abspielen und dadurch der Zytomorphologie nicht ohne Weiteres zugänglich sind.

Praxistipp

Voraussetzung für eine gute histopathologische Diagnostik ist eine ausreichend große Menge an repräsentativem Untersuchungsmaterial. Stanzbiopsien sollten daher eine Mindestlänge von 2 cm haben. Als Fixativ dienen formalinbasierte Lösungen.

3.3 Zytometrie und Immunphänotypisierung

Die prinzipiellen Vorteile zytometrischer Messungen bestehen in ihrer schnellen Verfügbarkeit und höheren Sensitivität (ca. 1 : 10 000). Darüber hinaus erlaubt die durchflusszytometrische Immunphänotypisierung eine genaue immunologische Klassifikation von Zellen. Dies ist von besonderer Bedeutung bei Lymphozyten, die sich trotz ihrer biologisch-funktionellen Unterschiede häufig nur wenig oder gar nicht morphologisch voneinander unterscheiden.

Klassische Indikationen für die Zytometrie in der Hämatologie sind daher die Identifikation von Zellen mit krankhaftem Proteinexpressionsmuster sowie die genaue Quantifizierung physiologischer Zellpopulationen unterschiedlichen Differenzierungsgrades oder unterschiedlicher Funktion.

Praxistipp

Die Interpretation durchflusszytometrischer Messergebnisse kann zuverlässig nur am Analyseinstrument selber oder einer speziellen Auswertestation erfolgen, da sie von den Geräteeinstellungen und Auswertestrategien abhängt. Dennoch kann es das Verständnis der Befunde verbessern, wenn das physiologische Expressionsmuster einzelner Proteine bekannt ist. Die Nomenklatur der immunologisch detektierbaren Proteine richtet sich nach den „Cluster of Differentiation“ (CD), die durch die International Union of Immunological Societies (IUIS) festgelegt und regelmäßig aktualisiert wird: <http://www.iuisonline.org>.

Besonders relevante Literatur

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th. ed. Geneva: WHO Press; 2008

Kommentar: In der WHO-Klassifikation hämatologischer und lymphatischer Neoplasien finden sich allgemein akzeptierte, aber nicht ganz aktuelle Angaben zum Antigen-Expressionsmuster verschiedener hämatologischer Erkrankungen.

3.4 Zyto- und Molekulargenetik

3.4.1 Zytogenetik

Unter zytogenetischen Untersuchungen versteht man einerseits die Bänderungsanalyse der Chromosomen (Karyotypisierung, ► Abb. 3.2a) und andererseits den fluoreszenzgestützten Nachweis von Chromosomenabschnitten (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, FISH, ► Abb. 3.2b). Darüber hinaus existieren noch einige Spezialverfahren zur Beantwortung besonderer Fragestellungen.

Prinzipiell kann die Zytogenetik entscheidende Informationen für die eigentliche Diagnosestellung liefern, z.B. Nachweis des Philadelphia-Chromosoms bei der CML, oder wichtige prognostische Daten bereitstellen (► Abb. 3.3), z.B. Nachweis einer 17p-Deletion bei der CLL. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist, dass es recht gut objektivierbar ist. Nachteilig sind die lange Untersuchungszeit von bis zu 10 Tagen (Bänderungsanalyse) sowie die hohen Anforderungen an die Kompetenz des Untersuchers.

Praxistipp

Für aussagekräftige Chromosomenanalysen müssen die betreffenden Zellen in ausreichender Menge und in teilungsfähiger Form vorhanden sein. Das Untersuchungsmaterial muss daher entsprechend ausgewählt und innerhalb von 24 h bei Raumtemperatur zum Labor transportiert werden. Eine nachträgliche Untersuchung an gelagertem Material ist nicht möglich. Als Antikoagulans eignet sich ausschließlich Heparin.

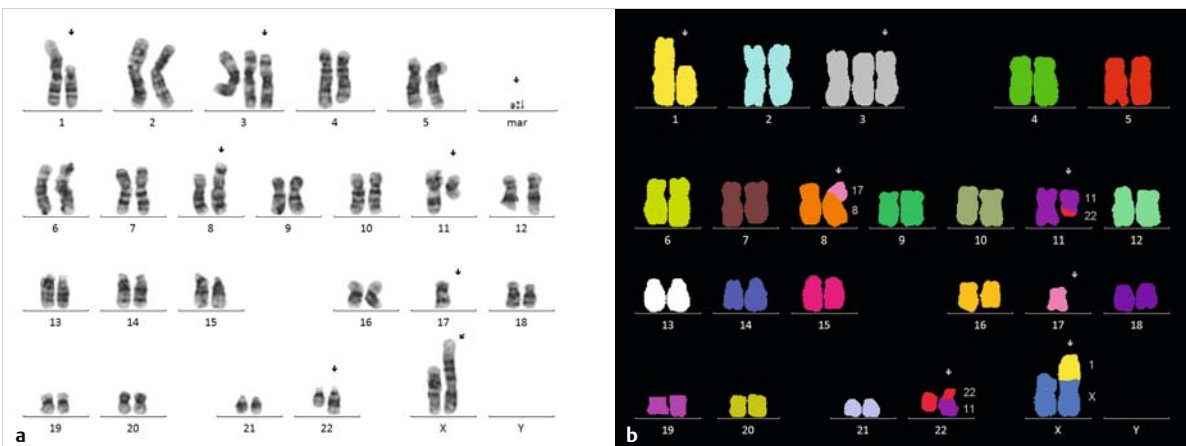


Abb. 3.2 Zytogenetische Untersuchungen.

- a** Bänderungsanalyse eines auffälligen Karyogramms. Es sind zahlreiche pathologische strukturelle Veränderungen (z. B. an den Chromosomen 1, 8, 22 und X) zu erkennen. Darüber hinaus bestehen als numerische Aberrationen eine Trisomie 3 und eine Monosomie 17.
- b** Multicolor-FISH zu demselben Fall. Hier lassen sich bereits ohne Spektralanalyse einige chromosomale Umlagerungen nachweisen. So findet sich z. B. am X-Chromosom Material von Chromosom 1 (gelb) oder am Chromosom 8 Material von Chromosom 17 (rosa).

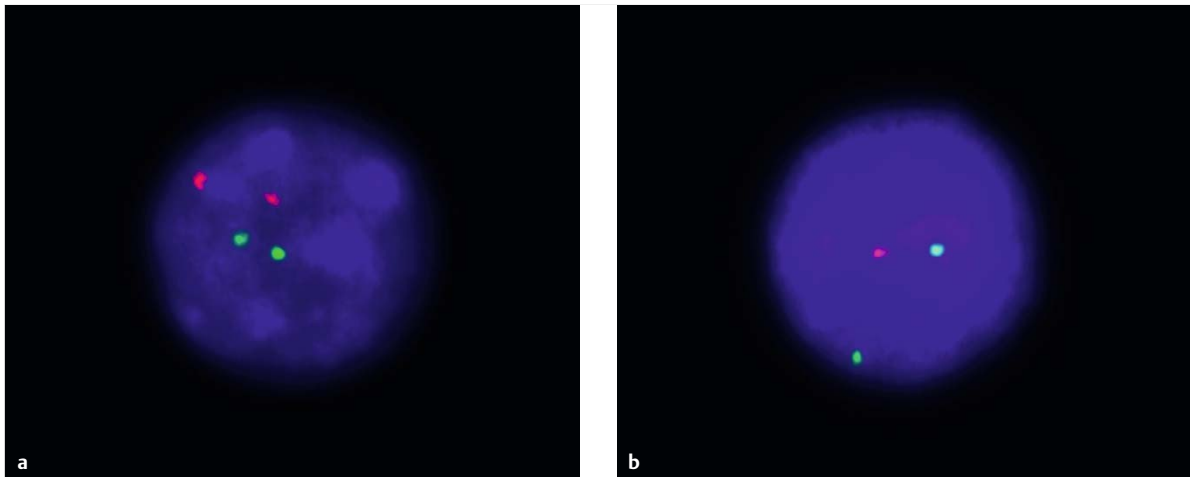


Abb. 3.3 FISH-Untersuchung an Interphasekernen einer CLL. Der Zellkern ist mit DAPI blau gefärbt. Das Zentromer des Chromosoms 11 ist grün gefärbt, der Locus für das ATM-Gen (11q22) ist rot gefärbt.

a Normal: 2 rote Signale.

b Das fehlende zweite rote Signal zeigt den Verlust von 11q22.

Tab. 3.4 Exemplarische klinisch-chemische Untersuchungen bei hämatologischen Erkrankungen.

Verdachtsdiagnose	Parameter
Eisenmangelanämie	Ferritin, Transferrin, löslicher Transferrinrezeptor
Megaloblastäre Anämie	Vitamin B ₁₂ , Folsäure, Parietalzell- und Intrinsic-Factor-Antikörper
Hämolyse	Laktatdehydrogenase, Haptoglobin, Bilirubin, Coombs-Test, Kälteagglutinine, G6PDH, osmotische Erythrozytenresistenztestung
Hämoglobinopathie	Hämoglobinelektrophorese
Lymphadenopathie	Infektionsdiagnostik (z. B. EBV, HIV, HBV, HCV, Rubeola, Histoplasma, Toxoplasma, Bartonella, Treponema), Autoimmundiagnostik (z. B. ANA, ANCA, Rheumafaktor, Anti-dsDNA-Ak)
Malignes Lymphom	Laktatdehydrogenase, β_2 -Mikroglobulin, HIV-Serologie
Plasmazellmyelom	Immundefixation (Serum/Urin), freie Leichtketten, Protein, Kalzium, Kreatinin, β_2 -Mikroglobulin
Leukämie	Laktatdehydrogenase
(Pan-)Zytopenie	Parvovirus-B19-Serologie, EBV-Serologie, CMV-Serologie, Hepatitis-Serologie, Erythropoetin, ANA, Rheumafaktor
Thrombotische Mikroangiopathie	ADAMTS 13-Aktivität, Shiga-Toxin (Stuhl)

ANA: antinukleäre Antikörper, ANCA: antineutrophile zytoplasmatische Antikörper, Anti-dsDNA-Ak: Antikörper gegen doppelsträngige DNA, CMV: Zytomegalievirus, EBV: Epstein-Barr-Virus, G6PDH: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, HBV: Hepatitis-B-Virus, HCV: Hepatitis-C-Virus

3.4.2 Molekulargenetik

Molekulargenetische Untersuchungsmethoden gewinnen immer mehr an Bedeutung in der Hämatologie. Sie bestehen durch ihre hohe Zuverlässigkeit, Sensitivität und Geschwindigkeit. Grob kann man PCR-basierende Verfahren von DNA-Sequenzierungstechniken unterscheiden. Auch die Molekulargenetik kann entitätsdefinierende Informationen (z. B. Nachweis der RNUX1-RUNX1T1-Fusion bei der AML) oder Prognosefaktoren (z. B. TP-53-Mutationsanalyse bei der CLL) beitragen. Von besonderem Interesse sind quantitative PCR-Techniken, die sich für die Verlaufsdiagnostik und den Nachweis einer residuellen Rest-erkrankung (Minimal residual Disease, MRD) eignen.

Praxistipp

Die Zuordnung zyto- und molekulargenetischer Befunde zu bestimmten Entitäten kann schwierig sein. Hier sind Online-Datenbanken sehr hilfreich (Auswahl):

- <http://www.atlasgeneticsoncology.org>
- <http://www.cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>

3.5 Klinische Chemie

Klinisch-chemische Untersuchungen sind auch für viele hämatologische Erkrankungen von Bedeutung. Sie können Informationen über Mangelzustände (Vitamin B₁₂, Folsäure, Eisen etc.) liefern, funktionelle Defektzustände (z. B. Hämoglobinelektrophorese, osmotische Resistenztestung der Erythrozyten, Immunfixation) analysieren oder als Surrogatparameter für die Krankheitsaktivität (z. B. Laktatdehydrogenase, freie Leichtketten) dienen.

Die Gerinnungsdiagnostik ist praktisch ausschließlich eine reine Labordiagnostik. Die Schwierigkeit für den klinisch tätigen Hämatologen besteht vor allem darin, die richtige Indikation für die jeweilige Untersuchung zu stellen. ► Tab. 3.4 zeigt, welche Untersuchungen bei welcher (Verdachts-)Diagnose indiziert sein können.

4 Diagnostische Methoden in der Onkologie

4.1 Zytologie

B. Bode-Lesniewska

4.1.1 Prinzip und Untersuchungsmaterialien

Zytologie stellt eine schnelle und minimalinvasive Methode für die direkte mikroskopische Beurteilung der Eigenschaften des Gewebes dar. Im Gegensatz zum Vorgehen bei den mindestens 4–5 h in Anspruch nehmenden histologischen Methoden werden die zytologischen Proben über 30–60 s in 96%igem Alkohol fixiert und können nach einer ca. 60- bis 90-minütigen Papanicolaou-Färbung vom Zytopathologen beurteilt werden. Manche Laboratorien bevorzugen für extragynäkologisches Untersuchungsmaterial die Fixation durch Lufttrocknung mit anschließender Giemsa-basierter Färbung (z. B. Diff-Quik).

► **Gynäkologische Zytologie.** Die gynäkologische Zytologie (PAP-Abstriche) befasst sich mit der mikroskopischen Analyse der Vorsorge-Abstriche aus dem Bereich des Gebärmutterhalses. Diese Methode stellt den bisher größten Screening-Erfolg der Medizingeschichte dar mit enormer Reduktion der Inzidenz und Mortalität des invasiven Zervixkarzinoms durch die Früherkennung der Vorstufen des Zervixkarzinoms. Die Befundung der PAP-Abstriche richtet sich nach der 2014 letztmals aktualisiert und international weitverbreiteten Bethesda-Klassifikation (► Tab. 4.1). In Deutschland werden die Diagnosen meistens gemäß der Münchner Klassifikation gestellt.

Tab. 4.1 Diagnoseklassen in der gynäkologischen Zytologie (bei repräsentativem Abstrich) gemäß Bethesda- und Münchner-System (vereinfacht).

Bethesda (2014)	München III
Keine intraepitheliale Neoplasie oder Malignität	PAP I und PAP II-a
ASC-US: atypische Plattenepithelien unklarer Bedeutung ASC-H: atypische Plattenepithelien, HSIL möglich	PAP II-p, PAP III-p
AGC-NOS: atypische glanduläre Zellen unklarer Bedeutung AGC-FN: malignitätssuspekte atypische glanduläre Zellen	PAP II-g, PAP III-g (e, x)
LSIL: geringgradige intraepitheliale Läsion	PAP IIID1
HSIL: höhergradige intraepitheliale Läsion	PAP IIID2, PAP IVa-p, PAP IVb-p
AIS: Adenocarcinoma in situ	PAP IVa-g, PAP IVb-g
Plattenepithelkarzinom	PAP V-p
Adenokarzinom	PAP V-g (e, x)

- **Extragynäkologische Zytologie.** Sie umfasst die mikroskopische Beurteilung von
 - Feinnadelpunktaten (FNP), z. B. Lunge, Lymphknoten (► Abb. 4.1), Schilddrüse, Pankreas etc.
 - Körperflüssigkeiten: Pleuraerguss (► Abb. 4.2), Aszites, Perikarderguss, Sputum, Urin, Liquor
 - Spülflüssigkeiten: Harnblase, Bronchien, Abdomen, Douglas-Raum

Die Zellen und kleinen Zellaggregate einschließlich Mistanzen, die mithilfe von dünnen Nadeln im Rahmen der den Patienten wenig belastenden und kostengünstigen Feinnadelpunktionen gewonnen werden, bzw. die Sedimente der Körper- und Spülflüssigkeiten werden einerseits direkt auf Objektträger ausgestrichen (► Abb. 4.1c, ► Abb. 4.2a), andererseits als formalinfixierte Zellblöcke (► Abb. 4.1d, ► Abb. 4.2c) aus dem Sediment der Proben verarbeitet. Zellblöcke stellen eine Brücke zwischen den zytologischen und histologischen Methoden dar und sind dem gleichen Spektrum der modernen immunhistochemischen und molekulargenetischen Zusatzuntersuchungen zugänglich wie Biopsien oder Resektate, z. B. Immunhistochemie (► Abb. 4.1d, ► Abb. 4.2c) oder Durchflusszytometrie (► Abb. 4.2b).

4.1.2 Gewinnung und Einsendung zytologischer Proben Körperflüssigkeiten

Sowohl physiologische (Urin, Sputum, Liquor) als auch pathologisch vermehrte (Aszites, Pleuraerguss, Perikarderguss) Körperflüssigkeiten enthalten Zellen, welche die zugrunde liegende Pathologie präzise erkennen lassen. Neben der Diagnostik von entzündlichen Prozessen inklusive Erregernachweis (virale Einschlüsse, Pilzelemente, Parasitenbestandteile) ist die Zytologie der Körperflüssigkeiten bestens geeignet für den Nachweis von malignen Zellen (► Abb. 4.2). Maligne Zellen können mithilfe von Zusatzuntersuchungen weiter subtypisiert und dem Ausgangspunkt des Primärtumors zugeordnet werden. Die therapie relevanten prädiktiven Faktoren lassen sich an Tumorzellen in Flüssigkeiten unter Anwendung von analogen Methoden wie an histologischen Proben erheben.

Die Einsendung von möglichst großen Mengen an Flüssigkeiten ist wichtig für die Gewinnung von Sedimenten mit großem Gehalt an diagnostischen Zellen. Die entscheidende Bedeutung dieser Grundregel kommt insbesondere bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorleiden zum Tragen, bei denen zielgerichtete („targeted“) Therapieoptionen je nach Ergebnis der Analyse der Zielmoleküle in Tumorzellen zur Anwendung kommen können.

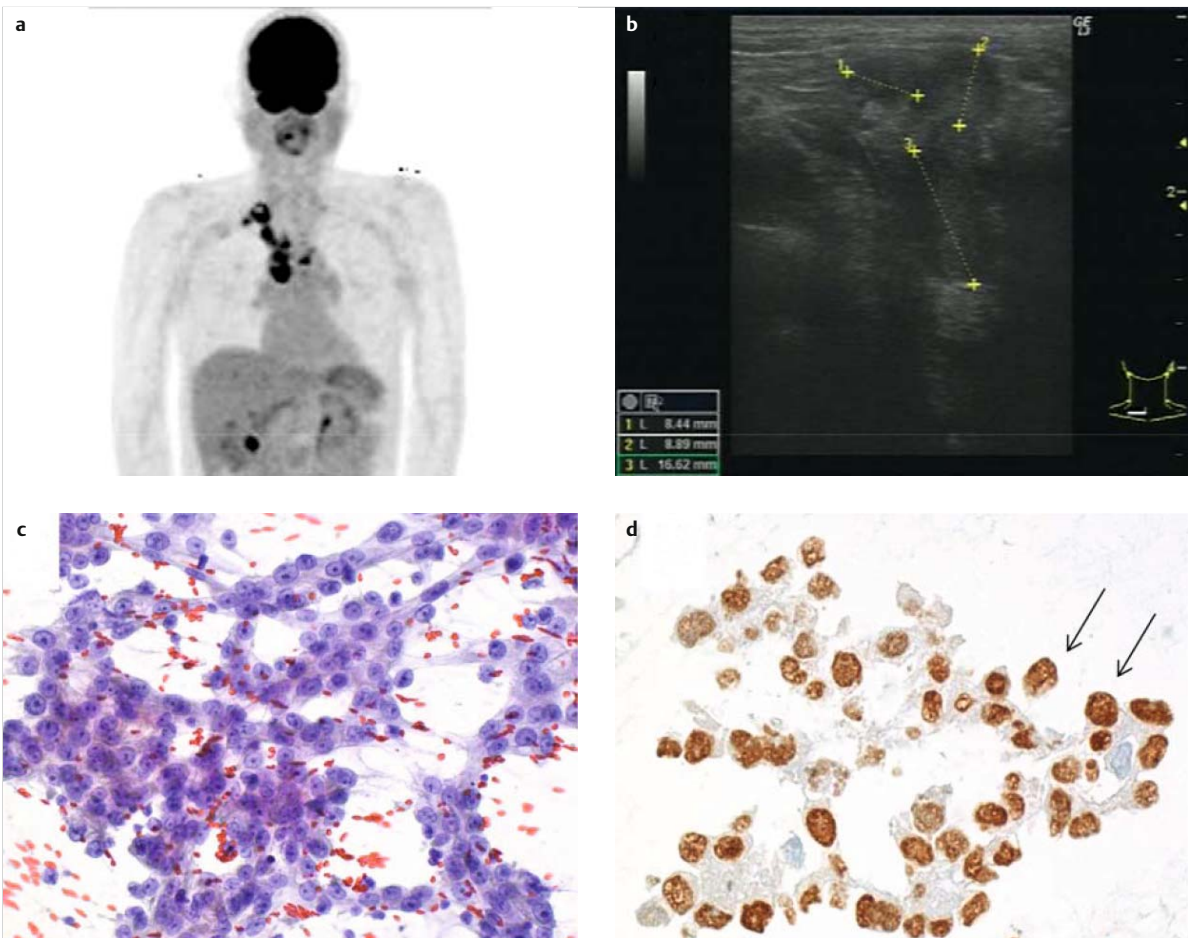


Abb. 4.1 Metastasiertes Lungenkarzinom bei einem 65-jährigen Patienten.

- a** PET-Befund mit zentraler Tumormasse und supraclavikulären Metastasen rechts.
b Sonografische Darstellung der oberflächlich gut zugänglichen pathologischen Lymphknoten vor einer ultraschallgesteuerten Feinnadelpunktion.
c Direktausstrich der FNP mit vielen malignen Zellen eines Adenokarzinoms (Papanicolaou-Färbung; Vergrößerung 200 ×).
d Immunohistochemische Darstellung der Expression von TTF1-Protein in den Kernen der Zellen des Adenokarzinoms im Material des Zellblocks (braunes Reaktionsprodukt, Pfeile; Vergrößerung 400 ×). Die Analyse des Tumorgewebes im Zellblock mittels PCR und Sequenzierung erbrachte keinen Nachweis einer EGFR-Gen-Mutation. Die AKL 1-Gen-FISH zeigte keine Translokation.

Praxistipp

Insbesondere bei der Frage nach Zielmolekülen in Tumorzellen für sog. „targeted“ Therapien müssen möglichst große Flüssigkeitsmengen eingesendet werden!

- **Urin.** Die zweite Morgen-Spontanurin-Probe ist am besten geeignet für zytologische Untersuchungen (die erste Urinprobe des Tages enthält zu viele degenerierte Zellen und ist nicht geeignet). Falls die Probe (mindestens 25–100 ml) das Labor innerhalb von 12 h erreicht, ist keine Fixation nötig. Bei Transportzeiten von 12–24 h ist eine Kühlung (4 °C) zu empfehlen und bei längeren Wegen die Fixation mit 50- bis 70%igem Ethanol (Verhältnis Ethanol : Volumen der Probe = 1 : 1).

► **Sputum.** Die optimale Sensitivität für die Diagnostik von Malignomen der Atemwege erreicht man mit zytologischen Untersuchungen des ersten tiefen Morgenauswurfs, der an 3 verschiedenen Tagen asserviert werden sollten. Für die Probensammlung sollen den Patienten Gefäße mit breiten Öffnungen mitgegeben werden. Die Sputumproben sollen nativ, d. h. ohne Fixation, ins Labor eingesandt werden. Während Sputum früher ein häufiges zytologisches Untersuchungsgut war, wird es heutzutage selten eingesandt, nicht zuletzt wegen der Degeneration der diagnostischen Zellen, was ihre Eignung für ggf. nötige Zusatzuntersuchungen mindert.

► **Liquor.** Liquorproben werden in der Regel durch Lumbalpunktion gewonnen, selten stammen sie direkt aus dem Ventrikelsystem. Bei klinischem Verdacht auf ZNS-

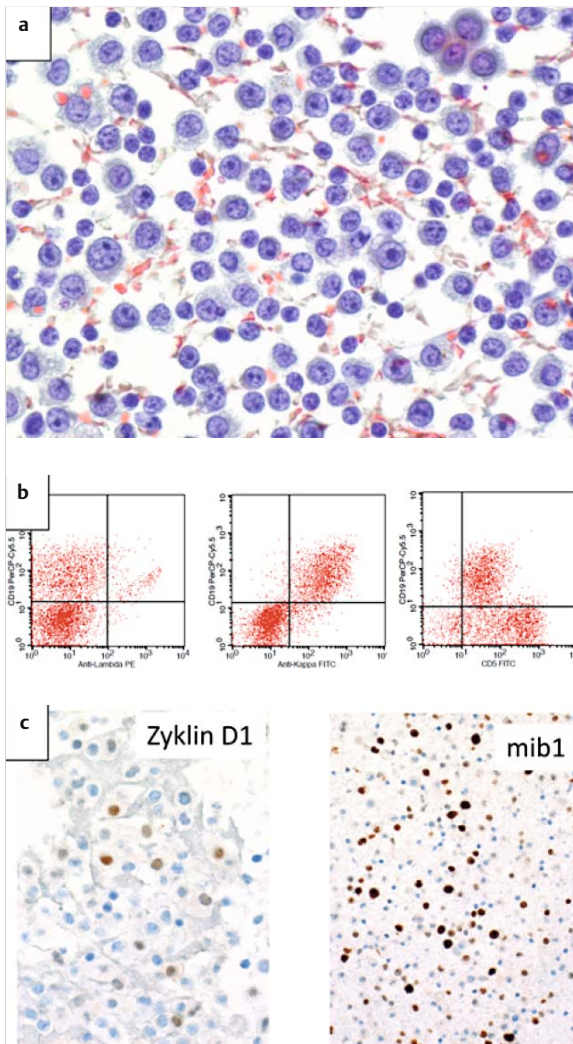


Abb. 4.2 Rechtsseitiger Pleuraerguss bei einem 83-jährigen Patienten mit anamnestisch bekanntem Mantelzell-Lymphom und Herzinsuffizienz.

- a** Sedimentausstrich (Papanicolaou-Färbung; Vergrößerung 200 ×) von 700 ml Ergussflüssigkeit mit vielen kleinen Lymphozyten neben zahlreichen Mesothelien und Histiocyten.
- b** Die Durchflusszytometrie zeigt eine κ -Leichtketten-restringierte, CD19⁺-CD5⁺-B-Zell-Population (ca. 40 % der lymphatischen Zellen) entsprechend einer Manifestation des Mantelzell-Lymphoms.
- c** Die Immunhistochemie im Zellblockmaterial ergibt die nukleäre Expression von Zyklin D 1 durch einen Teil der Lymphozyten und einen Proliferationsindex MIB-1 von ca. 20 % in den Lymphozyten.

Tumorbefall empfiehlt sich die Einsendung von ca. 10 ml Liquor. Da die Zellen im nativen Liquor schnell degenerieren, sollen sie sofort eingesendet werden. Bei Transportverzögerung sollten die Proben entweder bei 4 °C gekühlt werden (bei kurzen Verzögerungen von wenigen Stunden) oder bei längerer Verzögerung 1:1 mit 50%igem

Alkohol versetzt werden bzw. in Fixationsmedien entnommen werden (z. B. PreserveCyt, Hologic).

► **Ergüsse** (► Abb. 4.2). Die im Rahmen der Punktionen der entsprechenden Körperhöhlen entnommenen Flüssigkeiten müssen in möglichst großen Mengen (nicht unter 100 ml, bevorzugt Gesamtmenge abzüglich kleinen Proben für Hämatologie, klinische Chemie und/oder Mikrobiologie je nach Fragestellung) ins Zytologie-Labor eingesandt werden, da der Tumorzellgehalt des Sediments naturgemäß vom Volumen abhängt, aus dem es angefertigt wurde. Die Sensitivität der Zytologie für die Detektion von malignen Zellen kann bei langzeitbettlägerigen Patienten durch Lagerungswechsel direkt vor der Punktion gesteigert werden. Die Einsendung soll innerhalb von wenigen Stunden im nativen Zustand erfolgen, allenfalls heparinisiert zur Vorbeugung der Gerinnelbildung.

Spülflüssigkeiten

Spülflüssigkeiten von serösen Membranen (hauptsächlich Spülungen des Douglas-Raumes in der Gynäkologie oder Peritonealspülungen bei Karzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes) und Schleimhautoberflächen diverser Organe (Bronchien, Harnblase, Gallenwege) erlauben eine verbesserte Beurteilung der Ausbreitung der Tumorerkrankung. Die instillierte Spülflüssigkeit (in der Regel 50–200 ml physiologische NaCl-Lösung) wird gesammelt und unfixiert eingesandt. Das Sediment der Spülflüssigkeiten wird zytologisch analysiert im Hinblick auf die Anwesenheit maligner Zellen.

► **BAL**. Besondere Verarbeitungsmethoden werden in ausgewählten Fällen bei bronchioloalveolären Lavagen (BAL) angewandt, da die Indikation für diese Untersuchung nicht nur Tumorverdacht, sondern vor allem Erregerdiagnostik pulmonaler Infekte und Diagnostik von interstitiellen Lungenerkrankungen umfasst.

Feinnadelpunktionen

► **Durchführung**. Feinnadelpunktionen (FNP) sind zwar grundsätzlich einfach in der Durchführung, bedürfen aber für optimale Ergebnisse einer Erfahrung mit dieser Methode sowie enger Zusammenarbeit mit dem beurteilenden Zytopathologen und Korrelation mit der klinischen Situation und Bildgebung (► Abb. 4.1a, ► Abb. 4.1b). Sowohl tastbare als auch nur mittels Bildgebung darstellbare Raumforderungen können feinnadelpunktiert werden (nach Bedarf auch unter Ultraschall- bzw. CT-Steuerung). Eingesetzt werden dünne Nadeln (22–25 Gauge), mit denen je nach Präferenz des Punkteurs und je nach untersuchtem Organ mit oder ohne Unterdruck (Aspiration) das Zellmaterial aus der Läsion entnommen wird. Zu diesem Zweck wird die Nadel einmal durch die Oberfläche im Knoten platziert und anschließend mehrfach in-

nerhalb der Läsion in verschiedenen Richtungen („fächerförmig“) mit schneidenden Bewegungen über ca. 20–30 s eingestochen.

► **Asservierung und Untersuchungen.** Das auf diese Art gewonnene Material muss in Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung in geeigneten Medien für ggf. nötige Zusatzuntersuchungen asserviert werden. In einigen Zentren werden die Feinnadelpunktionen von Zytopathologen selbst bzw. von Ärzten anderer Fachrichtungen (Radiologie, ORL, Pneumologie, Gastroenterologie etc.) in Anwesenheit des Zytopathologen oder zytochemischen Assistenten durchgeführt, was die Bereitstellung des zytologischen Punktionsmaterials für die jeweils modernsten zur Verfügung stehenden pathologischen Untersuchungsmethoden gewährleistet. Als Grundlage der Entscheidungen zur Durchführung der Zusatzuntersuchungen werden obligatorisch 1 bis maximal 3 Direktausstriche angefertigt (► Abb. 4.1c). Das Restmaterial der Punktion wird in der Regel für die Anfertigung eines Zellblocks (► Abb. 4.1d) verwendet und kann – je nach klinischer Situation – mittels Durchflusszytometrie untersucht werden oder für mikrobiologische Analysen steril versandt werden. Am Material des Zellblocks kann genau das gleiche Spektrum an Untersuchungen wie an Biopsien zum Einsatz kommen einschließlich Immunhistochemie und Molekulargenetik.

4.1.3 Spektrum der Untersuchungsmethoden

Mikroskopie

Die Diagnosestellung an zytologischen Proben basiert auf der mikroskopischen Analyse von dreidimensionalen Formationen von Zellen bzw. Zellgruppen der Direkt- bzw. Sedimentausstriche. Je nach Präferenzen des lokalen Zytologie-Labors werden die Direktausstriche entweder in 95 %igem Ethanol fixiert (mindestens 30 s, für eine Papanicolaou-Färbung) und/oder luftgetrocknet (für Giemsa-basierte Färbungen). Unabhängig von der angewandten Methode ist die Herstellungszeit der Standardpräparate deutlich kürzer als in der Histopathologie und beträgt maximal 1–2 h.

„Rapid on-site Evaluation“ (ROSE)

Die Zytologie bietet sich aufgrund der kurzen Bearbeitungszeiten als ideale Methode an, um die Repräsentativität der Gewebeproben noch während der Entnahme abzuschätzen. Im Rahmen der „Vor-Ort-Beurteilung“ (engl. „rapid on-site evaluation, ROSE“) wird eine der Schnellfärbungen (max. 1–3 min dauernde Diff-Quik- bzw. modifizierte Papanicolaou-Färbung) verwendet, um den Zellgehalt des Punktates zu beurteilen. In Abhängigkeit von der lokalen Verfügbarkeit kann dies vom speziell ausgebildeten zytotechnischen Personal mit oder ohne An-

wesenheit eines Zytopathologen durchgeführt werden. Die definitive Diagnosestellung erfolgt zu späterem Zeitpunkt unter Berücksichtigung der Gesamtheit der Befunde und der Ergebnisse der nötigen Zusatzuntersuchungen.

Praxistipp

Besonders gut bewährt hat sich die ROSE im Rahmen von endosonografisch gesteuerten Eingriffen wie FNP des Pankreas oder bei endobronchial sonografisch (EBUS) gesteuerten FNP von Lungen- bzw. mediastinalen Tumoren.



Spezialfärbungen

Die zytologischen Präparate können für Spezialuntersuchungen verwendet werden, und zwar sowohl für den Erregernachweis (Gram, PAS, Ziehl-Neelsen) als auch für die Darstellung von speziellen Substanzen (Eisenfärbung; Kongorot-Färbung für Amyloidnachweis).

Zellblöcke

Das Restmaterial des Punktates wird nach Zugabe hämolyzierender Flüssigkeit (z. B. CytoLyt; Hologic) als verfestigtes Sediment (z. B. durch Gerinnungsbildung mit Plasma und Thrombin) in gepuffertem 4 %igem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Ein so entstandener Zellblock kann identisch weiterverarbeitet werden wie jede histologische Biopsie.

Immunzyto- und Immunhistochemie

Sowohl die zytologischen Ausstriche als auch die Schnitte der Zellblöcke können für Inkubationen mit spezifischen Antikörpern verwendet werden. Der entscheidende Vorteil der Zellblöcke besteht darin, dass man viele Inkubationen aus einer Probe veranlassen kann, während meistens nur eine begrenzte Anzahl von Ausstrichen zur Verfügung steht. Zusätzlich bestehen bei Zellblöcken methodisch keine Unterschiede im Vergleich zur Bearbeitung histologischer Proben. Zellblöcke sind deutlich länger haltbar ohne Einbuße der Gewebequalität.

Molekulare Diagnostik

Die zytologischen Ausstriche mit vollständig dreidimensional erhaltenen Zellkernen sind besonders gut für Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) geeignet, da das durch das Schneiden von Gewebe entstehende Artefakt der Kernfragmentierung entfällt. Die PCR-basierten molekulargenetischen Analysen wie Mutationsanalyse (Fallbeispiel der ► Abb. 4.1) und RT-PCR sind in identischer Weise für die zytologischen Zellblöcke wie für Biopsieproben anwendbar.