

CYTOLOGISCHES LABOR

Dr. med. T. Topalidis, MIAC

Döhrbruch 62 ▪ 30559 Hannover

Postfach 710461 ▪ 30544 Hannover

Tel.: (0511) 952-4711 ▪ FAX: 952-4769

E-Mail: dr.topalidis@cyto.de ▪ Internet: <http://www.cyto.de/>

Merkblätter und Anleitungen zur Gewinnung und Aufarbeitung des Cytologischen Materials

Grundsätzliche Regeln für die Materialaufarbeitung:

1. Es ist immer anzustreben, unabhängig von der Fragestellung oder Organ, möglichst luftgetrocknete, unfixierte Ausstrichpräparate anzufertigen (technisch wie periphere Blutaussstriche). Dies gilt besonders für alle aktiv frisch gewonnenen Zellen wie z.B. durch Punktionen, Biopsieabstriche oder Bürstenausstriche. Nur diese Materialaufarbeitung ermöglicht die Durchführung von Cytochemien und eine optimale Immuncytochemie.
2. Da in der Cytologie (im Gegensatz zur Histopathologie) die Ausstrichpräparate endgültige Einzelpräparate - ohne die Möglichkeit eines „Nachschnittes“ - sind, sollten bei der Entnahme, möglichst viele luftgetrocknete Präparate angefertigt werden (mindestens 8-10 Stück, s. auch Abb. 1 u. 2), um im Bedarfsfall cyto- bzw. Immuncytochemische Untersuchungen durchführen zu können. Zusätzlich ist auch damit zu rechnen, daß nicht jedes Ausstrichpräparat, die für die Diagnose wichtigen Zellen (z.B. Tumorzellen) enthält.
3. Von allen flüssigen Materialien sollte zusätzlich zu dem alkoholfixierten Material, luftgetrocknete Präparate angefertigt werden (s. unten). Ein Teil des Materials sollte jedoch auch immer mit mindestens 70% Alkohol im Volumenverhältnis 1:1 fixiert werden. Besonders zellarme Flüssigkeiten wie z.B. Liquor, Urin und Galle, sollten, wenn keine unverzügliche Aufarbeitung als luftgetrocknete Sediment-ausstriche oder Cytocentrifugenpräparate möglich ist, sofort mit Alkohol fixiert werden.
4. Bei Untersuchung von exfoliativen Material (z.B. Sputum oder Urin), ist eine zumindest dreimalige Untersuchung empfehlenswert, um die Sensitivität auf über 70 – 80% zu steigern. Dies kann über das Jahr verteilt oder auch hintereinander erfolgen.

Materialaufarbeitung im Speziellen:

1. SPUTUM

Indikation: Diagnose von Lungencarcinomen und deren Vorstufen. Besonders bei vorliegendem Verdacht auf ein Bronchoalveolarzell - Carcinom ist vor einer invasiven Diagnostik eine mindestens dreimalige Sputumuntersuchung empfehlenswert (Sensitivität bei 90%, Spezifität über 98%). Diagnose von benignen entzündlichen Erkrankungen (z. B. Asthma bronchiale).

Gewinnung und Aufarbeitung:

Zur cytologischen Untersuchung eignet sich am besten Sputum, das oft morgens (am besten nüchtern), aus dem Tracheobronchialbaum ausgeworfen wird (kein Mundspeichel!). Die Sputumuntersuchung soll möglichst an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt werden. Ist eine Expectorations nicht möglich, wird eine Provokation durch Inhalation von 2 ml 0,2%iger Bisolvon - Lösung oder anderem Sekretolyticum empfohlen. Das Sputum wird in einem Gefäß mit mindestens 70%igem Alkohol im Volumenverhältnis 1:1 (1 Teil Sputum, 1 Teil Alkohol) fixiert und auch so versandt. Hierfür stehen fertige mit Alkohol gefüllte Röhrchen zur Verfügung.

2. BRONCHOSKOPIEMATERIAL:

Indikation: Diagnose von benignen und malignen Lungenerkrankungen.

Möglichkeiten: Abhängig vom Material **a - i** können alle benignen oder malignen Lungenerkrankungen diagnostiziert werden. Für alle Erkrankungen bzw. Diagnosen gilt:

Von jeder gewonnenen Biopsie sollte eine **Imprintcytologie** (luftgetrocknet) angefertigt werden (s. Abb. 1 u. 2). Zusätzlich sollten Bronchusbürsten- Ausstriche durchgeführt werden (s. auch Abb. 3) besonders bei **flächhaften** und oder **multiplen** Veränderungen (wie z.B. bei Sarkoidose oder anderen **entzündlichen Erkrankungen** sowie **Dysplasien**) sollten Bürstenausstriche angefertigt werden. Dabei gilt es möglichst luftgetrocknetes Material (a - i) anzufertigen bzw. zu gewinnen.

Beim anfertigen der Bürstenausstriche bitte wir die Bürste „abzurollen“ und nicht „abzustreichen“ (s. auch Abb. 3).

Bronchoskopiematerial:

- a.** Bronchialsekret
- b.** Katheter- bzw. Saugbiopsie
- c.** Broncho- Alveolar- Lavage
- d.** Bronchus- Bürste
- e.** perbronchiales Lymphknotenpunktat
- f.** transbronchiale Biopsie
- g.** endobronchiales Feinnadelpunktat
- h.** transthorakale Punktion
- i.** Tupf- bzw. Imprint- Präparate von Probeexcisionen

Flüssige Materialien (a, b, c) müssen mit mindestens 70%igem Alkohol zu gleichen Teilen (1:1) versetzt werden. Von allen Materialien können jedoch auch luftgetrocknete Ausstrichpräparate angefertigt werden (8 -10 Stk.). Dies ist bei speziellen Fragestellungen, wie z. B. Differenzierung von Ausgangsorganen bei metastasierenden Tumoren oder Bestimmung der Lymphocyten – Subpopulationen mittel Immuncytochemie, in jedem Fall notwendig.

Die Materialien (d – i) werden auf sauberen Objektträgern ausgestrichen bzw. abgetupft, luftgetrocknet und ungefärbt eingesandt. Da alle cytologischen Ausstrichpräparate endgültige einzeln Präparate sind, benötigen wir zur Durchführung von cytochemischen oder immunocytochemischen Untersuchungen mehrere luftgetrocknete Präparate (8 -10 Stk.).

SPEZIELL FÜR DIE BAL (c):

Das flexible Bronchoskop wird lumenverschießend (WEDGE - Position) in einen Subsegmentbronchus, vorzugsweise der Lingula oder des Mittellappens, eingeführt. Die Oberlappen sind aus anatomisch - technischen Gründen weniger geeignet. Aus den Unterlappen wird durchschnittlich etwas weniger Lavageflüssigkeit zurückgewonnen.

Anschließend werden insgesamt 80-100 ml körperwarme, sterile physiologische NaCl - Lösung in fünf Einzelfractionen zu 20 ml instilliert. Nach jeder Instillation wird sofort wieder sanft aspiriert.

In der Literatur werden als Gesamtinstillationsvolumen bis zu 300 ml und mehr, als Einzelfraktion von 20 -100 ml empfohlen. Im allgemeinen werden 30 - 60% des instillierten Volumens zurückgewonnen.

Nach sorgfältigem Mischen sollte die Flüssigkeit immer, besonders dann wenn das Material sehr schleimig ist, zur Entfernung der Schleimflocken, durch einen grobmaschigen (Einlagigen), sauberen oder sterilen Mull „filtriert“ und die Gesamtmenge gemessen.

AUFARBEITUNG DER BAL ZUR BESTIMMUNG VON T4/T8- LYMPHOCYTEN

Diese immunocytochemische Untersuchung sollte nur an unfixierten Material durchgeführt werden. Daher müssen die Präparate schon in der Klinik angefertigt werden.

Dazu wird ein Teil der gewonnenen Lavageflüssigkeit (ca. 20 ml) bei mittlerer Drehzahl, z. B. 2000 U/min., 10 Minuten zentrifugiert. Vom Sediment werden dünne Ausstriche (8 – 10 Präp., technisch am besten wie Blutausstriche) hergestellt, die luftgetrocknet werden. Falls Sie über eine Cytozentrifuge verfügen, kann das Material auch damit aufgearbeitet werden. Dazu wird in jede Kammer 300 µl Lavageflüssigkeit eingefüllt und bei 500 U/min. 10 Minuten zentrifugiert. Die luftgetrockneten Präparate (8-10) werden dann eingesandt.

Die restliche Lavageflüssigkeit wird wie üblich zu gleichen Teilen mit mindestens 70%igem Alkohol versetzt und in unserem Labor aufgearbeitet.

3. PLEURA- ODER ASCITESPUNKTATE:

Um die besten Ergebnisse zu erzielen empfehlen wir, einen Teil des Punktates 10 Min. bei mittlerer Drehzahl (z.B. 1500 Umdrehungen/min.) zu zentrifugieren. Vom Sediment werden 8 - 10 **dünne** Ausstriche auf sauberen Objektträgern angefertigt, luftgetrocknet und unfixiert eingesandt (technisch wie z.B. periphere Blutausstriche). Falls eine Cytozentrifuge zur Verfügung steht, sollte, je nach Zellreichtum des Materials, wie unter der **BAL** beschrieben oder nach Anreicherung durch vorherige Zentrifugation, luftgetrocknete Cytozentrifugenpräparate angefertigt werden. Bis diese optimale Aufarbeitungsform etabliert ist, bitten wir einen Teil des Materials mit mindestens 70%igem Alkohol im Volumen-verhältnis 1:1 mischen und dann versenden. Nach Etablierung und Sicherstellung der korrekten Aufarbeitungsform, kann auf das alkoholfixierte Material verzichtet werden.

Sollte keine Cytozentrifuge zur Verfügung stehen, kann der Erguss in einem länglichen Gefäß (wie z. B. größeren Zentrifugenröhrchen), durch die Schwerkraftsedimentation, durch Stehenlassen für ca. 2 bis 4 Stunden an einem erschütterungsfreien Ort und nach vorsichtigem dekantieren des Überstandes, das Sediment ebenfalls wie oben beschrieben, aufgearbeitet werden.

4. CYSTENPUNKTATE (unabhängig vom Organ):

Der Cysteninhalte wird grundsätzlich wie unter Punkt 3 (Ergüsse) verarbeitet. Bei dickflüssigem oder offensichtlich zellreichen Material (wie z. B. Pus, oder Blutungscysten), sollten sofort oder unverzüglich dünne, luftgetrocknete, unfixierte Ausstriche (ebenfalls 6 - 8 Präparate) angefertigt werden (technisch wie z.B. Blutausstriche).

5. FEINNADEL-ASPIRATIONSPUNKTATE (direkte Organpunktate, z.B. Leber, Niere, Haut, Lymphknoten, Schilddrüse u.s.w.):

Bei allen Punktionscytologien, wird unabhängig vom Organ, das Material wie ein Blutausstrich dünn ausgestrichen, luftgetrocknet und unfixiert eingesandt (bitte auch hier mind. 8 - 10 Ausstriche anfertigen).

6. PRÄPARATION VON DIVERSEN BIOPSIEMATERIALIEN UND ASPIRATIONS-BIOPSIEN (unabhängig vom Organ):

Punktionsmaterialien und Bürstenabstriche von verschiedenen Organen werden auf sauberen Objektträgern möglichst dünn, unter Vermeidung von Quetschungen, ausgestrichen bzw. abgerollt und luftgetrocknet (s. auch Abb. 1 u. 2). Bitte 8 - 10 Ausstriche einsenden. Das Biopsiestück kann nach dem Ausstreichen weiter für die Histologie verwendet werden (s. auch Abb. 4).

Von Probeexcisionen (PE's) vom MAGEN, BRONCHUS, LYMPHKNOTEN, MAMMA, LUNGE, MILZ, LEBER, SCHILDDRÜSE, PROSTATATA u.s.w. sollten ebenfalls luftgetrocknete, unfixierte Tupfpräparate bzw. Abstrichpräparate (sog. Imprintcytologien) angefertigt werden und parallel sowie unabhängig von der Histopathologie cytologisch untersucht werden (Abb. 4), wenn möglich mind. 6 - 8 Stück, (s. auch Abb. 1 u. 2)). Diese Präparate bitte ebenfalls **NICHT** fixieren, sondern nur lufttrocknen lassen, mit dem Namen des Patienten beschriften und in den dafür vorgesehenen, von uns zur Verfügung gestellte Versandhülsen einsenden. Die Biopsie kann nach dem abtupfen weiter für die Histologie verwendet werden.

7. URIN (Spontanurin):

Indikation: Diagnostik (auch zum Screening) von Harnblasencarcinomen, Tumoren der ableitenden Harnwege (Nierenbecken sowie Harnleiter) und Verlaufsbeobachtung nach Therapie maligner Tumoren. Im Spätstadium (Einbruch ins Nierenbecken), ist auch die Diagnose von Nierenzellcarcinomen möglich.

Daneben kann der Urin auch zur Diagnostik von benignen Erkrankungen, wie z. B. bakteriellen Harnwegsinfekten, Virusinfektionen -auch wenn sie generalisiert sind- (z.B. CMV, HPV, Herpes) oder Pilzinfektionen, genutzt werden.

Damit die Sensitivität der Urincytoogie über 70 – 80 % liegt, wird die cytologische Untersuchung von mindestens drei Proben empfohlen. Dies kann nacheinander oder im Abstand von ca. 3 Monaten erfolgen. **Es sollte nach Möglichkeit Spontanurin verwendet werden. Wird jedoch Katheterurin, Urin aus einer Ersatzblase, Harnblasen- oder eine Nierenbeckenspülung eingesandt, so bitten wir dieses unbedingt auf dem Einsendeschein zu vermerken!**

Für die urincytoologische Untersuchung sollte **möglichst nicht** der Morgenurin verwendet werden. Hierfür ist am besten Urin geeignet, der nach dem Trinken von reichlich Flüssigkeit (z.B. ca. 1 Liter Tee oder Wasser), als frisch gelassener Mittelstrahl - Urin gewonnen wird. Der Urin sollte **unverzüglich** mit mindestens 50% Alkohol (70 - 95% Alkohol sind ebenfalls geeignet) unverzüglich zu gleichen Teilen (Volumenverhältnis Urin:Alkohol = 1 : 1) zur Fixierung versetzt werden. Hierfür sind speziell vorbereitete mit Alkohol gefüllte Röhrchen sowie Versandhüllen vorhanden. Es sollten mindestens 15 – 20 ml Urin untersucht werden, um eine ausreichende Zellmenge untersuchen zu können.

Steht eine Aufarbeitungsmöglichkeit als Sedimentausstrich oder Cytozentrifugat zur Verfügung, so kann und sollten, bei speziellen Fragestellungen wie z. B. Keimdifferenzierung, Virusinfektion, Nierenzelltumoren u.ä.), **parallel zusätzlich**, luftgetrocknete Ausstriche angefertigt werden.

8. GYNÄKOLOGISCHE ABSTRICHE:

Diese sollten sofort nach Entnahme fixiert werden (in der Regel durch handelsübliche Spray- fixativa wie z. B. das Merkofix oder Äther/Alkohol zu gleichen Teilen). Falls kein Fixativum zur Verfügung steht, kann der Ausstrich auch luftgetrocknet eingesandt werden.

Endometriumbstriche wie unter 6. beschrieben einsenden.

9. LIQUOR:

Die gewonnene Flüssigkeit sollte möglichst sofort nach der Entnahme unfixiert mit der Cytozentrifuge aufgearbeitet werden (s. oben). Auch hier mind. 4 – 6 Präp. anfertigen. Falls diese Aufarbeitungsform nicht möglich ist, sollte der Liquor **unverzüglich** mit mindestens 70%igem Alkohol versetzt und anschließend versandt werden. Die erste Methode gibt morphologisch die besseren Ergebnisse.

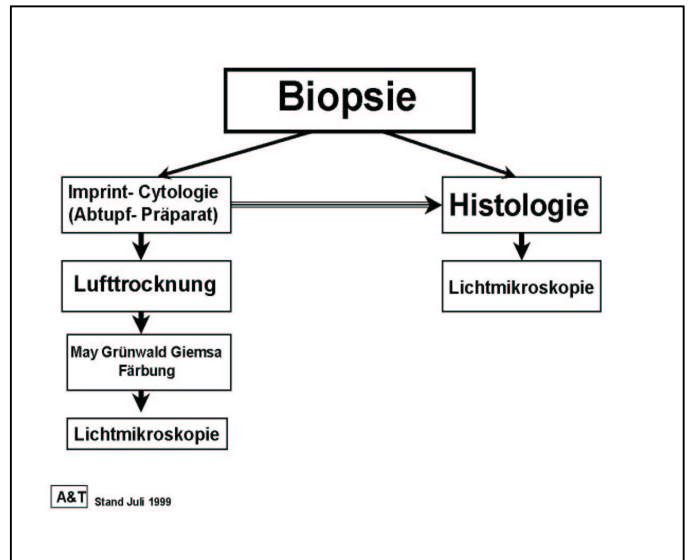
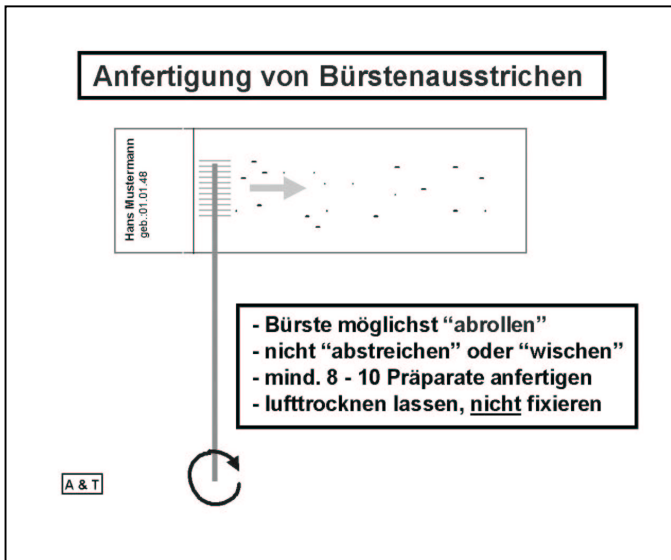


Abb. 1 Anfertigen von Bürstenausstrichen Abb. 2 Ablauf bei Imprint-Cytologien

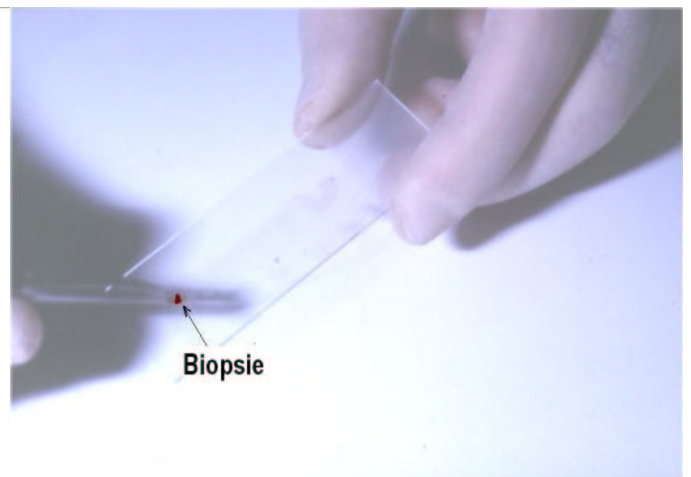
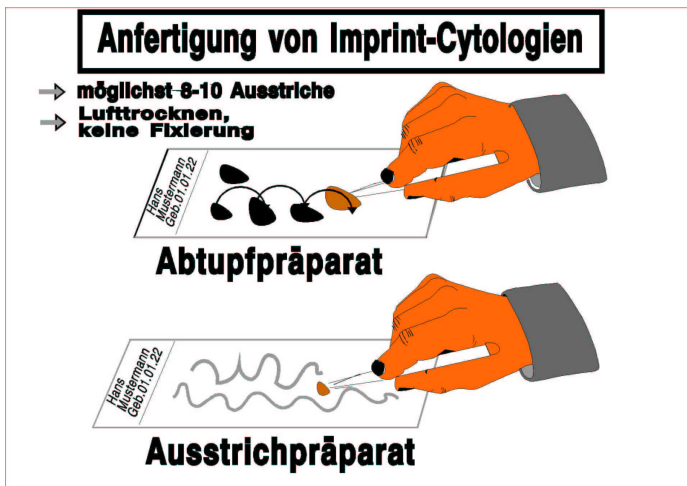


Abb. 3 Anfertigen von Imprint-Cytologien

Abb. 4 Anfertigen von Imprint-Cytologien

Alle eingesandten Materialien (Flüssigkeiten und Ausstriche) müssen deutlich lesbar, mit Namen und Geburtsdatum des Patienten versehen sein, um Verwechslungen auszuschließen.

Versandmaterialien wie Einsendescheine, Objektträger, Objektträgerhülsen, Röhrchen mit oder ohne Alkohol und Versandtüten, können Ihnen auf Wunsch zugesandt werden. Sie können diese übers Internet unter <http://www.cyto.de/> anfordern.

CYTOLOGISCHE DIAGNOSE

Neben einer klaren, definierten, cytologischen Freitext – Diagnose, wenden wir auch für die **nicht - gynäkologische Cytologie**, eine modifizierte PAPANICOLAOU - Klassifikation an. Diese ermöglicht eine klare Zuordnung und Festlegung der Malignitätsvorstufen bzw. Malignität seitens der Klinik.

Modifizierte Papanicolaou – Klassifikation (nach Atay):

PAPANICOLAOU - KI.: I

Ohne pathologischen Befund bzw. unauffälliges Zellbild für das Organ oder des Materials.

PAPANICOLAOU - KI.: II

Gutartige Veränderungen (Entzündungen, Metaplasien, gutartige Tumoren und Stoffwechselerkrankungen).

PAPANICOLAOU - KI.: III

Zellproliferationen mit Atypien bzw. unklarer Befund.
Eine baldige Wiederholung der Untersuchung wird empfohlen.

PAPANICOLAOU - KI.: III D

Dysplasie (leichte -, mittlere - oder schwere Dysplasie).
Eine Verlaufskontrolle wird empfohlen.

PAPANICOLAOU - KI.: IV a

Carcinoma in Situ.

PAPANICOLAOU - KI.: IV b

Semimaligner, nicht metastasierender Tumor, z.B. Carcinoid.
Verdacht auf invasives Carcinom oder spärlich Tumorzellen.
Eine Wiederholung zur endgültigen Sicherung wird empfohlen.

PAPANICOLAOU - KI.: V

Sicherer Malignitätsnachweis. Invasives Carcinom oder sehr viele Tumorzellen.

Für die Interpretation der Malignitätsvorstufen (auch sog. „Grenzbefunde wie Pap III, IIID oder teilweise auch IV a und IVb) und Bestimmung des Handlungs- oder Behandlungsablaufes nach solchen Befunden, steht ein gesondertes Informationsblatt zur Verfügung (auch unter der Internet – Adresse: <http://www.cyto.de/>).

Mit freundlichen Grüßen

Dr. med. Th. Topalidis

Stand August 2001