

Gewinnung und Aufarbeitung von cytologischem Material

Grundsätzliche Regeln für die Materialaufarbeitung

1. Es ist immer anzustreben, unabhängig von der Fragestellung oder dem Organ, möglichst luftgetrocknete, unfixierte Ausstrichpräparate anzufertigen (technisch wie periphere Blutausstriche). Dies gilt besonders für alle aktiv frisch gewonnenen Zellen wie z.B. durch Punktionen, Biopsieabstriche oder Bürstenausstriche. Nur diese Materialaufarbeitung ermöglicht eine optimale Morphologie, die Durchführung von Cytochemien und eine zuverlässige 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 20-30 Stück, s. auch Abb. 1 u. 2), um im Bedarfsfall cytochemische, immuncytochemische bzw. molekularpathologische 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 sollten dünne, luftgetrocknete Sediment- Ausstrichpräparate angefertigt werden (s. unten). Wenn keine Möglichkeit zum Anfertigen von luftgetrockneten Präparaten besteht können zusätzlich zu einem Röhrchen von unfixiertem Material auch alkoholfixiertes Material eingesandt werden. Dies kann jedoch entfallen wenn ausreichend Ausstrichpräparate zur Verfügung stehen. Besonders zellarme Flüssigkeiten wie z.B. Liquor, Urin und Galle, sollten, wenn keine unverzügliche Aufarbeitung als luftgetrocknete Sedimentaustriebe oder Cytocentrifugenpräparate möglich ist, sofort mit Alkohol fixiert werden. Der Alkohol sollte mindestens 50%ig sein. Die Art des Alkohols (Methanol-, Äthanol- oder Isopropyl-Alkohol) ist dabei gleichgültig. **Ausnahme:** Ergüsse (Pleura, Ascites, Perikard oder Gelenkergüsse) sollten nicht mit Alkohol fixiert sondern nativ eingesandt werden.
4. Bei Untersuchung von exfoliativem 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.
5. Bei Feinnadelpunktaten bitten wir das gesamte Material ausschließlich als luftgetrocknete, nicht fixierte, dünne Ausstrichpräparate einzusenden (grundsätzlich gilt so viele Ausstriche wie möglich).

6. Bitte bei Feinnadelpunktaten das Material nicht in Flüssigkeiten geben (gleichgültig ob Kochsalz- oder Fixierlösung).
7. Beim Anfertigen der Sedimentausstriche bitte vom Mattrand weg ausstreichen. Auch hierbei die Präparate bitte möglichst dünn anfertigen (pro Objektträger ca. einen halben Tropfen).
8. Bitte verwenden Sie ausschließlich Objektträger mit Mattrand. Diese werden von uns kostenlos zur Verfügung gestellt. Den Mattrand bitte mit einem Bleistift beschriften. Hierbei genügen die Initialen des Patienten und die genaue Unterteilung des Materials in lesbaren arabischen oder römischen Ziffern. Bitte die Objektträger nicht mit den Patientenaufklebern oder anderen Aufklebern bekleben. Diese müssen mit zusätzlichem Aufwand entfernt werden und es besteht dabei das Risiko, dass das Material bzw. der Objektträger dabei beschädigt wird. Bei allen Materialeinsendungen bitten wir möglichst eine genaue Materialangabe zu verwenden. Dabei ist auch die Wahl des Instruments und der Zugangsweg von entscheidender Bedeutung.

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 Expectoration 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 bis zu einem Volumenverhältnis 1:1 (maximal 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 flächenhaften 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).

Material:

- 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 (10 -12 Stk.). Dies ist bei speziellen Fragestellungen, wie z. B. Differenzierung von Ausgangsorganen bei metastasierenden Tumoren oder Bestimmung der Lymphocyten - Subpopulationen mittels 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 Einzelpräparate sind, benötigen wir zur Durchführung von cytochemischen oder immuncytochemischen Untersuchungen mehrere luftgetrocknete Präparate (10 -12 Stk.). Bei Bronchialspülungen bitte kein Aqua-Dest verwenden!!!

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 Einzelfraktionen zu 20 ml instilliert. Nach jeder Instillation wird sofort wieder sanft aspiriert. Bitte niemals Aqua-Dest zum Spülen verwenden!!! In der

Literatur werden als Gesamtinstillationsvolumen bis zu 300 ml und mehr, als Einzelfraktion 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 werden.

Aufarbeitung der Bal zur Bestimmung von T4/T8- Lymphocyten

Diese immuncytochemische Untersuchung sollte nur an unfixiertem Material durchgeführt werden. Daher müssen die Präparate schon in der Klinik angefertigt werden. Dazu wird ein Teil der gewonnenen Lavageflüssigkeit (ca. 20 - 30 ml) bei mittlerer Drehzahl, z. B. 3000 U/min., 15 Minuten zentrifugiert. Vom Sediment werden dünne Ausstriche (10 - 12 Pröp., 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 ca. 300 µl Lavageflüssigkeit eingefüllt und bei 500 U/min. 10 Minuten zentrifugiert. Die luftgetrockneten Präparate (10-12 Stck.) werden dann eingesandt. Die restliche Lavageflüssigkeit wird wie üblich zu gleichen Teilen mit mindesten 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 10-15 Min. bei mittlerer Drehzahl (z.B. 1500-2000 Umdrehungen/min.) zu zentrifugieren. Vom Sediment werden 15-20 dünne Ausstriche auf sauberen Objektträgern angefertigt, nur luftgetrocknet (Bitte nicht fixieren!) eingesandt (technisch wie z.B. periphere Blutausstriche). Falls eine Cytocentrifuge zur Verfügung steht, sollte, je nach Zellreichtum des Materials, wie unter der BAL beschrieben oder nach Anreicherung durch vorherige Zentrifugation, luftgetrocknete Cytocentrifugenpräparate angefertigt werden. Die alleinige Aufarbeitung mit Sedimentausstrichen ist jedoch völlig ausreichend! Sollte keine Cytocentrifuge 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 Cysteninhalt wird grundsätzlich wie unter Punkt 3 (Ergüsse)

verarbeitet. Bei dickflüssigem oder offensichtlich zellreichem Material (wie z. B. Pus, oder Blutungscysten), sollten sofort oder unverzüglich dünne, luftgetrocknete, unfixierte Ausstriche (ebenfalls 10 - 12 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. 10 - 12 Ausstriche anfertigen).

6. Präparation von diversen Biopsiematerialien und Aspirationsbiopsien (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 10 - 12 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, Prostata 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. 10 - 12 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 gestellten Versandhüllen 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 Urincytoologie 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 urincytologische 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) zu gleichen Teilen (Volumenverhältnis Urin:Alkohol = 1 : 1) zur Fixierung versetzt werden. Hierfür sind speziell vorbereitete mit Alkohol gefüllte Röhrchen sowie Versandhülsen vorhanden. Es sollten mindestens 15 - 20 ml Urin untersucht werden, um eine ausreichende Zellmenge untersuchen zu können. 4 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 können nach Entnahme fixiert werden (in der Regel durch handelsübliche Spray- fixativa wie z. B. das Merkofix oder Äther/Alkohol zu gleichen Teilen). Dies ist jedoch nicht unbedingt notwendig. Wir empfehlen jedoch die Präparate nur lufttrocknen zu lassen. Es hat keine Auswirkungen auf die Morphologie. Die Objektträger am Mattrand bitte mit einem Bleistift mit dem Namen der Pat. beschriften. Endometriumabstriche 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. 10 - 12 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.

GRAFIKEN Abb. 1 und 2 : Anfertigen der Imprint- Cytologien (Tupfpräparate). Abb. 3 Anfertigen von Bürstenausstrichen Abb. 4 Ablauf bei Imprint- Cytologien

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

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 - Kl.: I

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

PAPANICOLAOU - Kl.: II

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

PAPANICOLAOU - Kl.: III

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

PAPANICOLAOU - Kl.: III D

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

PAPANICOLAOU - Kl.: IV a

Carcinoma in Situ.

PAPANICOLAOU - Kl.: IV b

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

PAPANICOLAOU - Kl.: 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. lle Informationen sind auch unter der Internet - Adresse:
<http://www.cyto.de> auch als pdf- Datei zu erhalten. Für evtl. Frage stehe ich Ihnen gerne telefonisch zwischen 8.00 Uhr und 16.30 Uhr werktags zur Verfügung.

Druckdatum: 05.03.2021