

XTRA | 2/2019 | Themenblatt Nr. 2

Das Duett: Zytomorphologie trifft Liquorzytologie

Datum: Oktober 2019
Thema: Hämatologie, Zytomorphologie, Liquorzytologie
Herausgeber: Sabine Haase, Barbara Schroeder, Sysmex
Nummer: V1.0

Die Zytomorphologie und Liquorzytologie spielen bei hämatologischen und onkologischen Systemerkrankungen eine große Rolle. Entzündliche Erkrankungen, Tumorerkrankungen und der Nachweis einer spezifischen Phagozytose stellen die Domäne der Liquorzytologie dar. Auch bei den meisten hämatologischen Erkrankungen wie z.B. akuten Leukämien, Lymphomen und myelodysplastischen Syndromen spielt die Liquorzytologie eine große Rolle. Im Krankheitsverlauf dieser Erkrankungen kann es zu einem Befall des zentralen Nervensystems (ZNS-Befall) kommen.

Tumorerkrankungen, die mit einem ZNS-Befall einhergehen können:

- Non-Hodgkin-Lymphome
 - CLL (chronisch lymphatische Leukämie)
 - MM (multiples Myelom)
- Hodgkin-Lymphome
- CML (chronische myeloische Leukämie)
- akute Leukämie wie ALL / AML
- MDS (myelodysplastische Syndrome)
- MPS (myeloproliferative Syndrome)

Wird der Verdacht einer hämatologischen Systemerkrankung geäußert, muss sich der Patient in den meisten Fällen einer Knochenmarkspunktion unterziehen. Eine Vielzahl von Untersuchungen des peripheren Blutes und Knochenmarks sind notwendig, um die Diagnose zu sichern. Es erfolgen zytomorphologische, zytogenetische und immunologische Untersuchungen.

Die Indikationen für die Knochenmarkpunktion eines Patienten sind:

- Verdacht auf eine primäre Knochenmarkerkrankung
- pathologische Zellen im lichtmikroskopischen Differentialblutbild
- Panzytopenie
- Anämie mit Retikulozyten < 30/nl und normale Werte für MCV, Folsäure, Vitamin B12, EPO, Ausschluss Blutung
- Agranulozytose
- unklare Thrombozytopenie
- Fieber unklarer Ursache
- Verdacht auf hämatologische Systemerkrankung
- Staging bei malignen Erkrankungen

Die Knochenmarkdiagnostik

Seit 1971 wird Knochenmarkpunktion standardgemäß nach Jamshidi am hinteren Beckenkamm durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich, Knochenmark zu aspirieren sowie eine Knochenmarkbiopsie (eine Stanze) für den Histologen zu gewinnen. Da es selten zu einer lokalen Komplikation kommt, ist es für den Patienten je nach Gesundheitszustand möglich, die Punktion auch ambulant durchzuführen. Eine Alternative zu dieser Methode ist die Sternalpunktion. Die Punktion wird am Sternum durchgeführt, leider jedoch ohne Möglichkeit, eine Knochenmarkstanze zu entnehmen.



Bildnachweis: <http://flexikon.doccheck.com/de>

Abbildung 1: Knochenmarkpunktion

Die Zytomorphologie

Die Zytomorphologie ist die Basisdiagnostik für die hämatologischen Systemerkrankungen. Sie wird zur Sicherung der Diagnose, zur Klassifikation von Erkrankungen und zur Verlaufskontrolle im Therapieverlauf eingesetzt. Die Beurteilung von Blut und Knochenmarkausstrichen erfolgt durch die panoptische Färbung (May-Grünwald-Giemsa Färbung) sowie durch verschiedene zytochemische Färbungen, die die Differenzierung und Zuordnung maligner Zellen und gesunder Zellen erlauben.

Der periphere Blutausstrich ist ein wichtiger Bestandteil der hämatologischen Untersuchung. Bei ordnungsgemäßer Herstellung können folgende Informationen entnommen werden: Leukozytendifferenzierung, Untersuchung der Erythrozyten- und Leukozytenmorphologie, Abschätzung der Leukozyten- und Thrombozytenzahl.

Der Knochenmarkausstrich ist ein zytologisches Präparat, welches bei der Knochenmarkpunktion durch Aspiration von Knochenmarkbröckel und Knochenmarkblut gewonnen wird. In der Regel werden Quetschpräparate oder Tropfpräparate angefertigt, die gut zu beurteilen sind. Die zytologische [...] Untersuchung eines Knochenmarkausstrichs ist im Hinblick auf eine hämatologische Systemerkrankung entscheidend. Im Knochenmarkpräparat wird der Zellgehalt wie auch die Morphologie der Einzelzellen (z.B. die prozentualen Anteile der Dysplasien in der Granulopoese, der Erythropoese und der Megakaryopoese) beurteilt und das Verhältnis zwischen Erythropoese und Granulopoese zueinander begutachtet. Für eine korrekte diagnostische Einteilung ist die Quantifizierung bestimmter kernhaltigen Zellen, wie z.B. der genaue prozentuale Anteil der Blasten, durch die Erstellung eines Myelogramms unumgänglich. In der Regel erfolgt eine Auszählung von 500 kernhaltigen Zellen.

Morphologische Zelldifferenzierung

Für die panoptische Färbung nach Pappenheim wurde von der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie ein Standard festgelegt. »Checkliste« aus der Publikation der DGHO: Binder T, Diem H, Fuchs R, Gutensohn K, NT. Pappenheim-Färbung: Beschreibung einer hämatologischen Standardfärbung – Geschichte, Chemie, Durchführung, Artefakte und Problemlösungen. J Lab Med 2012; 36:29

Zytochemische Färbeverfahren werden zur Charakterisierung von Blut- und Knochenmarkzellen eingesetzt. So z.B. die Myeloperoxidase, die das Leitenzym der Granulopoese und somit die wichtigste Methode zur Differenzierung akuter myeloischer und akuter lymphatischer Leukämien darstellt. In einem gewissen Umfang werden weitere Färbeverfahren wie die PAS, die Esterase und die saure Phosphatase zur hämatologischen Diagnostik eingesetzt. Die Berliner-Blau Färbung dient im wesentlichen zur Abklärung einer Anämie, zur Darstellung von extrazellulärem und intrazellulärem Eisen sowie der Darstellung von Ringsideroblasten, ein Dysplasiezeichen der Erythropoese wie bei einem Myelodysplastischen Syndrom.



Abbildung 2: Das vollautomatisierte Ausstrich- und Färbesystem SP-50 von Sysmex ermöglicht eine standardisierte Färbung

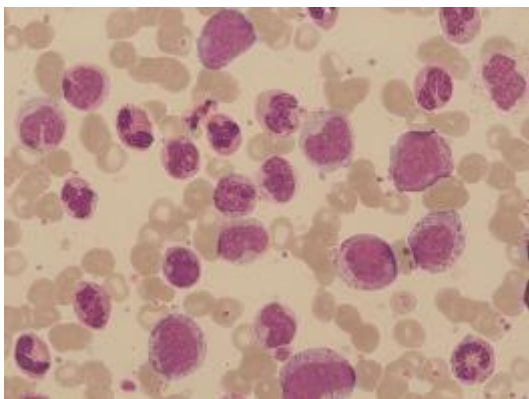


Abbildung 3: Peripheres Blut: chronische myeloische Leukämie (CML). Pappenheim Färbung

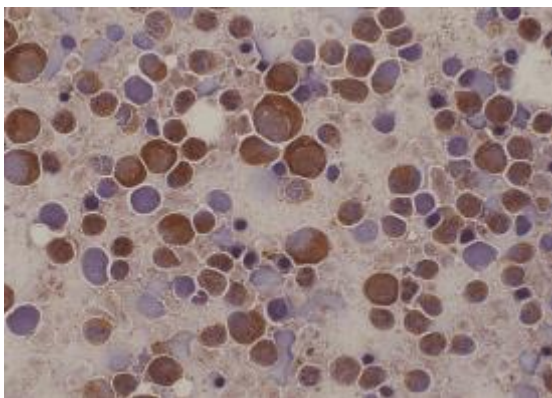


Abbildung 4: Peripheres Blut: chronische myeloische Leukämie (CML). POX Färbung (Myeloperoxidase Färbung), dunkelbraune Darstellung granulopoetischer Zellen

Immunphänotypisierung

Die Immunphänotypisierung wird zur Sicherung der Diagnose, Prognoseabschätzung und Therapien von hämatologischen Neoplasien eingesetzt und gehört mit zur Basisdiagnostik. Diese sehr sensitive Methode ist bei der Klassifizierung der Leukämien und Lymphomen von zentraler Bedeutung.

Bei dieser Methode werden Antigene an Zellen der verschiedensten Körperflüssigkeiten, membranständige oder zytoplasmatische, mit spezifischen Antikörpern markiert und mittels multiparametrischer Durchflusszytometrie bestimmt und quantifiziert. Die Zellen werden mit ein oder mehreren Laserstrahlen abgetastet. Aus der Streuung des Lichtes erhält man Hinweise auf die Größe und Art der Zellen. Die zusätzliche Markierung der eingesetzten spezifischen Antikörper mit Fluoreszenz-Farbstoffen erlaubt eine Zuordnung der Zellen durch ein bestimmtes Antigenexpressionsmuster. So können im Blut, im Knochenmark, im Liquor aber auch in anderen Körperflüssigkeiten hämatologische Neoplasien diagnostiziert werden.

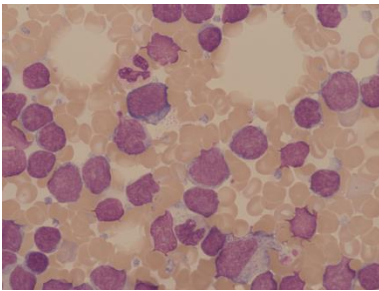


Abbildung 5: Mantelzell-Lymphome im peripheren Blut (Pappenheim-Färbung)

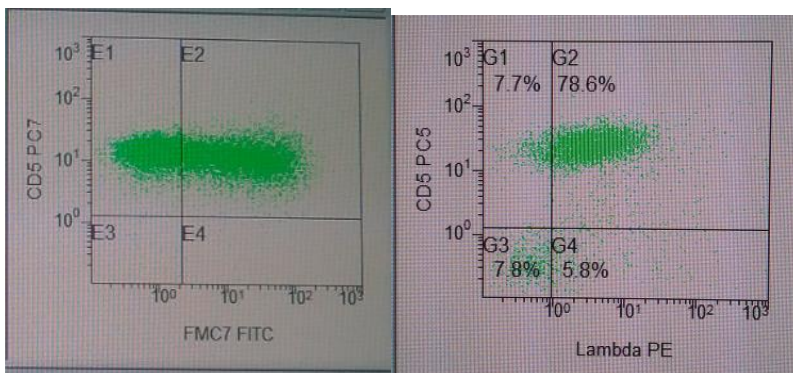
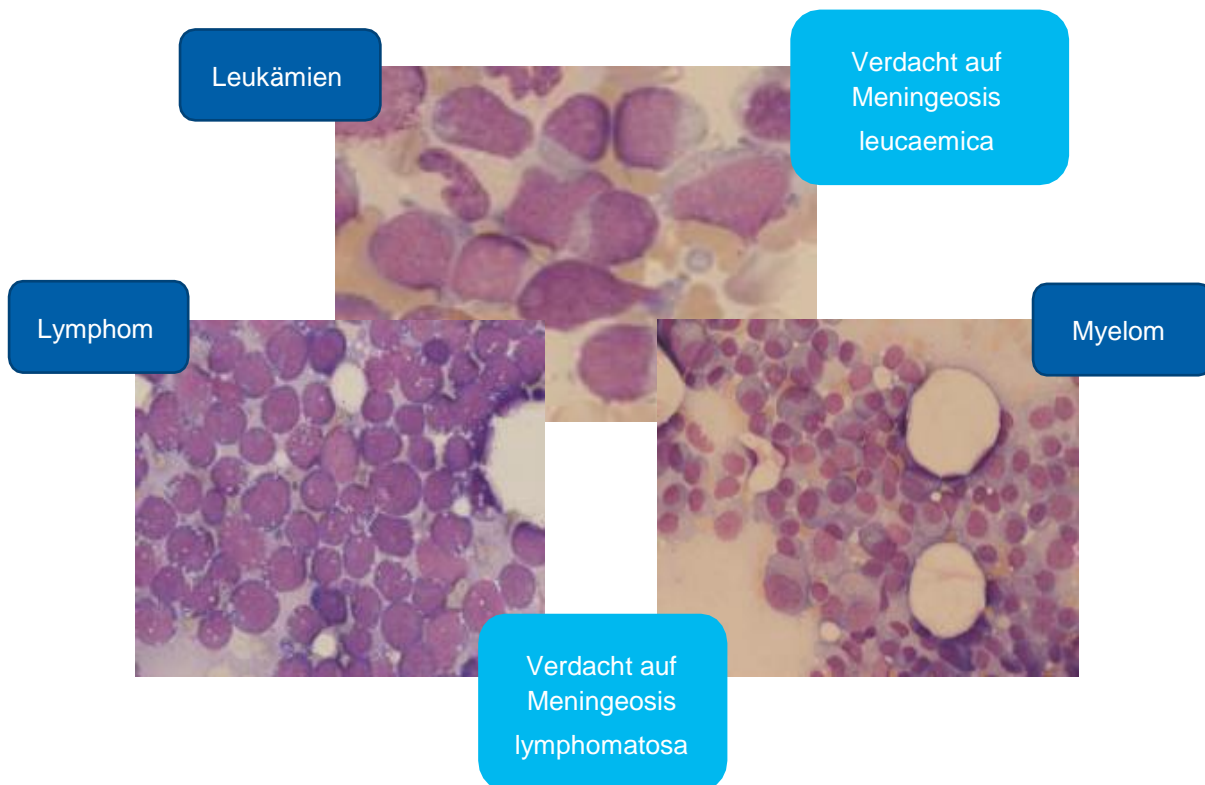


Abbildung 6: Mantelzell-Lymphome im peripheren Blut Immunphänotypisierung: PAN-B-Zellmarker, CD5+, CD20+, FMC7+. B-Zelle: Leichtkettenrestriktion Lambda

Was passiert nun bei der Fragestellung: Liegt bei dem Patienten ein ZNS-Befall im Rahmen seiner hämatologischen Erkrankung vor? Anhalt für eine Meningeosis? Maligne Zellen, Tumorzellen im Liquor?

Die Diagnosestellung eines ZNS-Befalls erfordert bei diesen Patienten eine hohe Aufmerksamkeit, da die neurologischen Symptome (z.B. Erbrechen, Schluckbeschwerden, Taubheitsgefühle, Doppelbilder, Verwirrtheit) sehr unspezifisch sein können und auch durch die Erkrankung selber, die Nebenwirkung einer Chemotherapie oder einer immunsuppressiven Therapie sein können.

Lymphome und Leukämien, vor allem lymphatische und in geringerem Ausmaß auch myeloische Leukämien, können zu Ansiedlungen in die Meningen führen. Die Artdiagnose wird normalerweise aus dem peripheren Blut, dem Knochenmark oder dem Lymphknoten gestellt und ist zum Zeitpunkt der Diagnose einer meningealen Tumorsiedlung meist schon bekannt.



Bei dem Verdacht einer akuten lymphatischen Leukämie ist bei Erstdiagnose neben der Durchführung einer Knochenmarkuntersuchung eine Liquorpunktion obligatorisch. Statistisch gesehen, kommt es bei ca. 5-10 % der ALL-Patienten zu einem ZNS-Befall.

Das Zellbild im Liquor ist monomorph und besteht überwiegend aus Tumorzellen, die sich morphologisch nicht von denen der Peripherie unterscheiden. Hochmaligne Lymphome und akute Leukämien sind morphologisch meist gut erkennbar. Die selten im Liquor anzutreffenden niedrig-malignen Lymphome können zytomorphologisch meist nicht von gutartigen Zellen unterschieden werden.

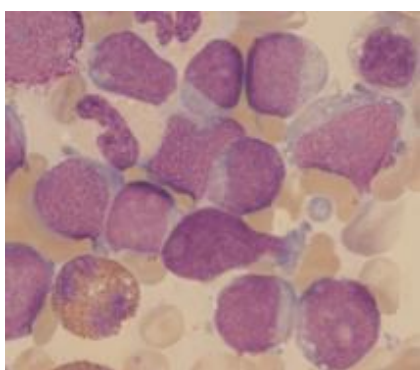


Abbildung 7: Knochenmark: Kortikale T-ALL. Pappenheim Färbung

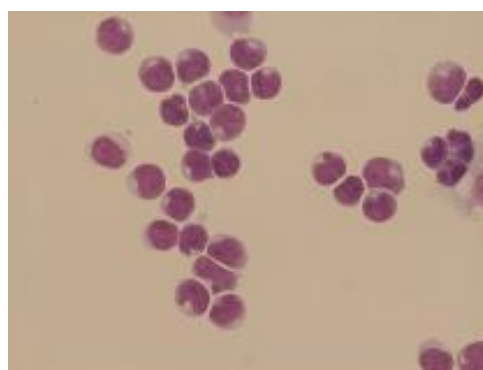


Abbildung 8: Liquor-Zytospinpräparat: Kortikale T-ALL. Pappenheim Färbung

Liquor – ein Material mit besonderen Ansprüchen

Liquor als Untersuchungsmaterial erfordert durchgehend besondere Aufmerksamkeit, sowohl bei der Vorbereitung und Durchführung der Probengewinnung als auch beim Transport und der sich anschließenden Labordiagnostik. Nach Eintreffen des Liquors im Labor geht es um eine möglichst schnelle und sorgfältige Bearbeitung durch das Laborpersonal.

Liquor ist ein Material, das nur in begrenzten Mengen abgenommen werden kann. Die Labordiagnostik erfordert im Schnitt 5 -10 ml. Die ärztliche Laboranforderung bestimmt die Auswahl der Parameter, die, über das Grundprogramm hinausgehend, für eine gezielte Diagnostik erforderlich sind. Der Liquor sollte in mehr als zwei verschlossenen Polypropylenröhrchen ohne Konservierungszusatz aufgefangen werden. Die Röhrchen sollten vorab nummeriert, mit den Patientendaten beschriftet und mit der Angabe der Entnahmezeit versehen werden. Eine Anleitung zum richtigen Vorgehen bei der Entnahme und beim Probentransport ist hilfreich und wird vielerorts vom Labor zur Verfügung gestellt. Das erste Röhrchen ist für die chemischen Parameter Eiweiß, Glukose und Lactat bestimmt, das zweite für die Mikrobiologie, das dritte für Zellzählung und Zelldifferenzierung, das vierte für weitere Untersuchungen.

Vorausgesetzt, dass der Liquor unmittelbar nach der Abnahme und unter geeigneten Transportbedingungen im Labor eingetroffen ist, gilt es, unverzüglich die Zellzahl zu bestimmen und Präparate für die Liquorzytologie anzufertigen. Mitunter wird ein erlaubtes Zeitfenster von 1-2 Stunden zwischen der Liquorgewinnung und der Zellzählung angegeben, doch können die Zellen, speziell die neutrophilen Granulozyten, bereits innerhalb der ersten Stunde lysieren, was damit den Aussagegehalt der Zellzählung schmälern bzw. verfälschen kann.

Präanalytik in der Liquorzytologie

Hierzu ein Zitat aus dem Atlas der praktischen Liquorzytologie (Herausgegeben von H. Kluge, V. Wieczorek, E. Linke, K. Zimmermann, Otto W. Witte) auf S.6: „Zum Verständnis der in der Liquorzytodiagnostik streng einzuhaltenden präanalytischen Vorschriften soll zunächst die wahrscheinlich wichtigste Ursache für die Empfindlichkeit der Liquorzellen nach der Punktion vorangestellt werden: Als normalerweise zell- und eiweißreicher Körperflüssigkeit fehlen dem Liquor im Gegensatz zum Blut praktisch die beiden Hauptpuffersysteme: hoher Eiweißgehalt und zelluläre Oberflächen. Die nahezu einzige Pufferkapazität im Liquor stellt das Bikarbonat/CO₂-System dar. Am hängenden Tropfen, also unter Luftzutritt gewonnen, verliert der Liquor durch Abgabe seines CO₂ an die Luft aufgrund des großen Konzentrationsgefälles zur Luft auch diese Pufferkapazität nahezu spontan. Der pH schlägt sekundenschnell von 7.32-7.36 (Normalbereich im Liquor) auf alkalische Werte bis pH 7.8 und höher um. Dadurch werden in nicht stark blutigen (also auch in den meisten pathologischen) Liquores mit Eiweißkonzentrationen unter 3000mg/l unabhängig von der Zellzahl weißer Zellen aufgrund fortschreitender kataboler Mechanismen bereits deutliche Zelluntergänge bzw.- Schädigungen provoziert. (Im früheren Sprachgebrauch wurde gelegentlich der irreführende Begriff „Liquor als zellfeindliches Milieu“ verwendet.)“

Visuelle Beurteilung und Bestimmung der Zellzahl

Vor der Zellzählung erfolgt eine makroskopische Beurteilung des Liquors. Steht keine automatisierte Methode, z. B. Zellzählung am Blutbildanalyzer mit einer BF-Applikation der XN-Serie zur Verfügung, wird die Zellzahl mikroskopisch in der Fuchs-Rosenthal-Kammer ermittelt.

Normalwerte:

- Erwachsene: Leukozyten < 5µl keine Erythrozyten
- Neugeborene (bis 3.Monat): Leukozyten<15Zellen/µl, Erythrozyten <500/µl

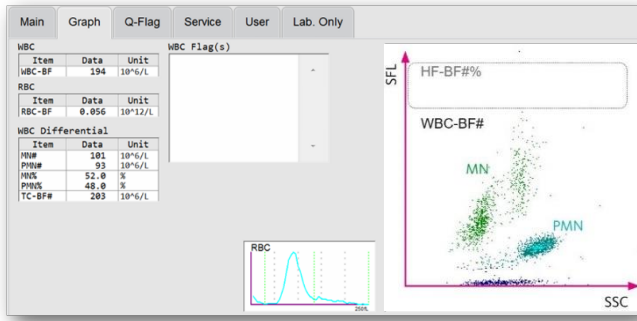


Abbildung 9: Befundbeispiel Body Fluid Zählung am XN-1000 von Sysmex

Nach der Zellzählung schließt sich die Herstellung des zytologischen Präparates mittels Vorzentrifugation und Zytozentrifugentechnik mit Aufarbeitung eines Kulturmediums an. Die Zytozentrifugation mit Vorzentrifugation ist eine Methode für eine quantitativ gute Zellausbeute, für eine rasche Verfügbarkeit und für eine qualitativ gute Darstellung der Liquorzellen. Die Verfügbarkeit der fast kompletten Liquorflüssigkeit ist für Nachfolgeuntersuchungen bei dieser Methode gewährleistet.

Die Anfertigung des Zytospinpräparates sollte möglichst innerhalb einer Stunde nach Abnahme erfolgen. Degenerative Veränderungen erschweren eine zytologische Beurteilung. Die fertigen Zytospinpräparate können nach einem zeitlich angepassten MGG-Färbeprotokoll in Glasküvetten gefärbt werden. Steht ein automatisiertes System zur Verfügung (z. B. SP-50), werden die Präparate mit dem Färbeprotokoll für Differenzialblutbilder gefärbt. Anschließend erfolgt die zytologische Beurteilung am Mikroskop. Falls zur Zellerkennung vorhanden, kann das DI-60 Digitalmikroskop mit der Body Fluid Applikation zur Vordifferenzierung eingesetzt werden.

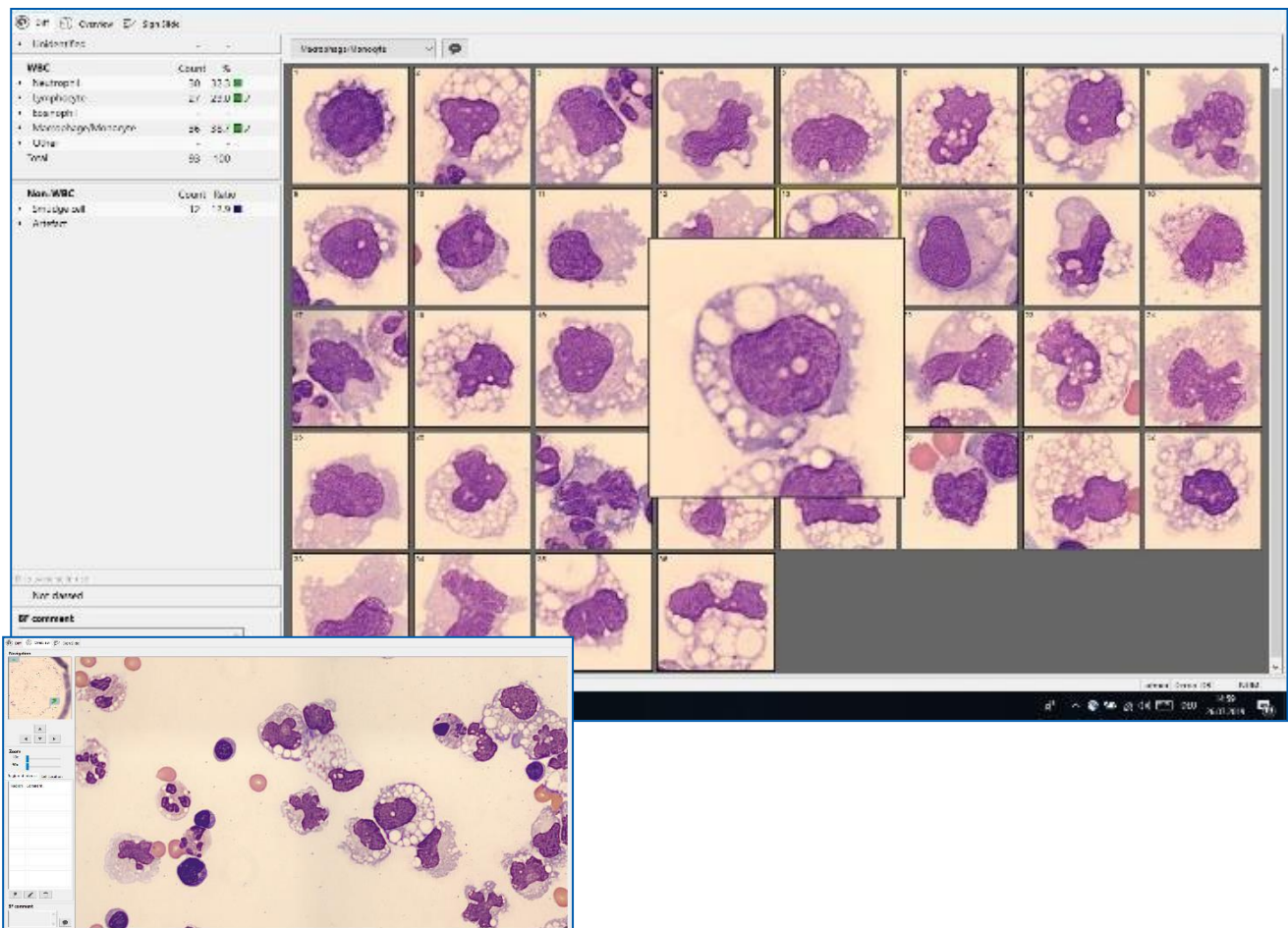


Abbildung 10: Ausschnitt eines gescenten Präparates am DI-60 von Sysmex

Färbungen in der Liquorzytologie

May - Grünwald - Giemsa - Färbung

Bei Verdacht auf Tumorerkrankung, Enzephalitis oder MS, entzündlichen Erkrankungen.

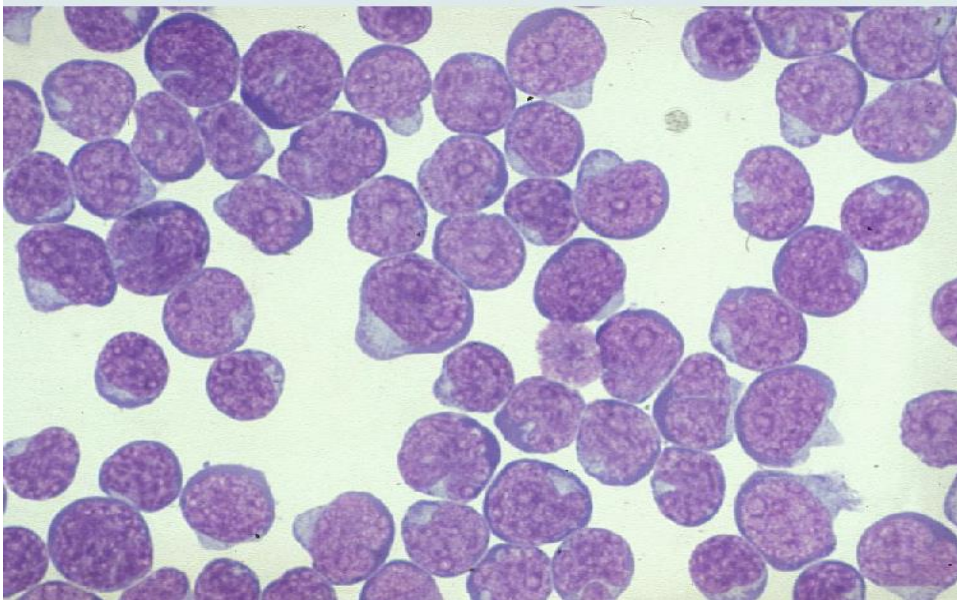


Abbildung 11: Liquor NHL

Berliner - Blau - Reaktion

Bei Verdacht auf Blutungen in den Liquorraum.

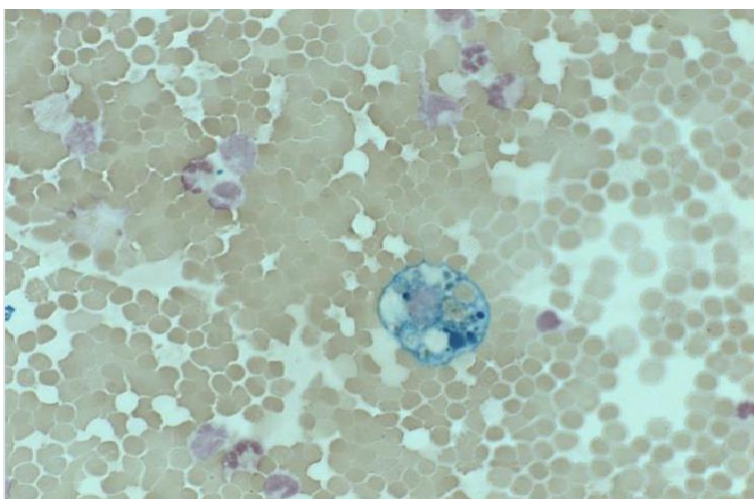


Abbildung 12: Liquor Fe- Färbung mit einem Sideroerythrophagen