

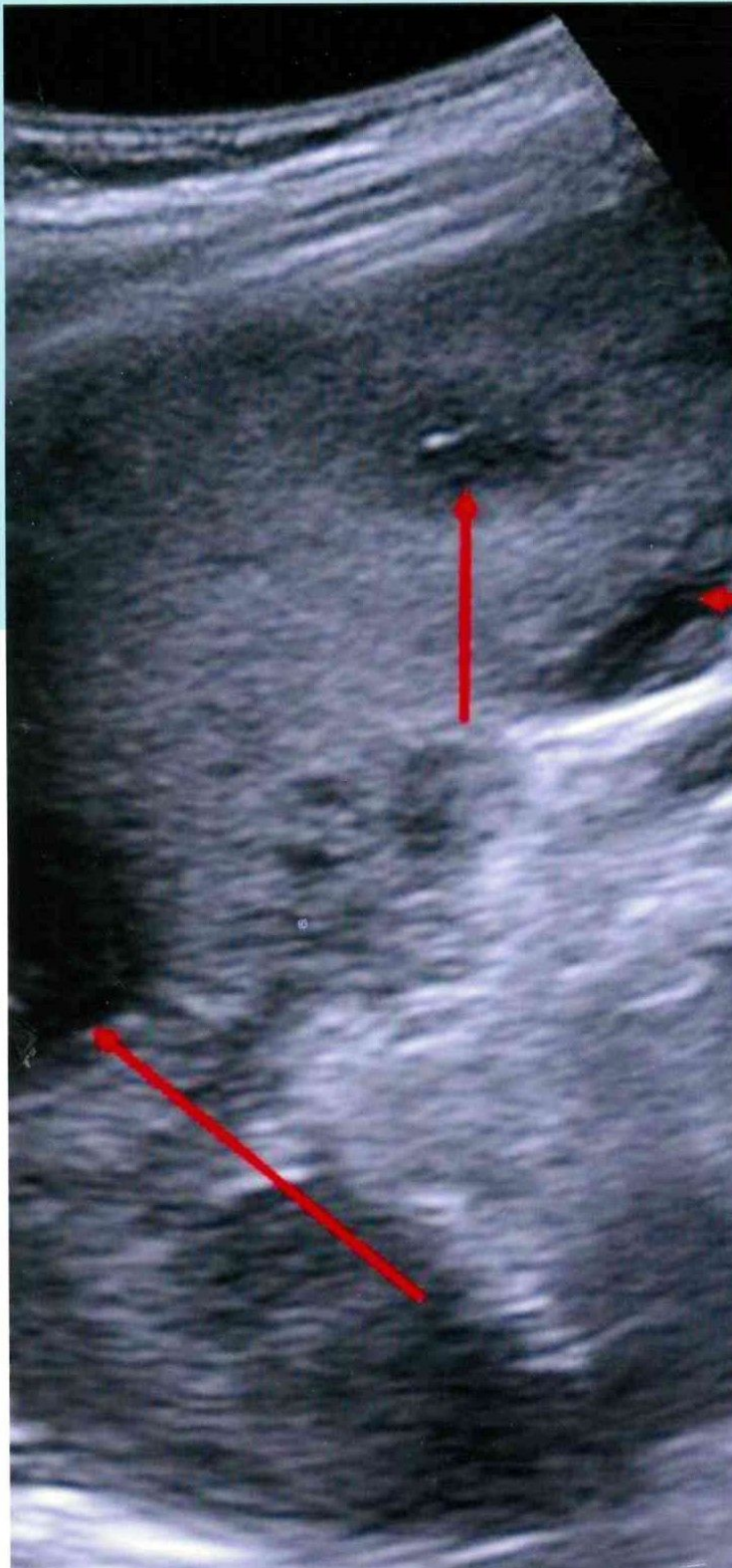
Zeitschrift für

# Gastroenterologie

German Journal of Gastroenterology

12

Dezember 2017  
Seite 1267–1548  
55. Jahrgang



S3-Leitlinie

## Kolorektales Karzinom

- Glutenfreie Ernährung – Update 2017
- Konservative Therapie eines aseptischen Abszesssyndroms mit Milzabszessen bei M. Crohn
- Darmkrebsvorsorgeprogramm: Einfluss von Einladungsbriefen auf die Teilnehmerate

 1913 DGVS  
Deutsche Gesellschaft für  
Gastroenterologie,  
Verdauungs- und  
Stoffwechselkrankheiten

Offizielles Organ für:  
Deutsche Gesellschaft für  
Gastroenterologie,  
Verdauungs- und Stoff-  
wechselkrankheiten mit  
Sektion Gastroentero-  
logische Endoskopie  
Österreichische Gesellschaft  
für Gastroenterologie und  
Hepatologie

# Verbesserte mikroskopische Diagnostik des ösophagealen Soorbefalls durch zusätzliche Zytospin-Analyse der Fixationslösung von Ösophagusbiopsien

## Enhanced microscopic diagnosis of oesophageal candidiasis through additional cytospin analysis of the fixative of oesophageal biopsies

### Autoren

Sören Schröder, Thomas Günther

### Institut

Gemeinschaftspraxis Pathologie – Hamburg

### Schlüsselwörter

Ösophagitis, Candida, Diagnostik, Histologie, Zytologie

### Key words

oesophagitis, candida, diagnostics, histology, cytology

eingereicht 29.11.2017

akzeptiert 06.04.2018

### Bibliografie

DOI <https://doi.org/10.1055/a-0606-5689>

Online-Publikation: 9.5.2018

Z Gastroenterol 2018; 56: 752–755

© Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart · New York

ISSN 0044-2771

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Sören Schröder

Gemeinschaftspraxis Pathologie – Hamburg,

Lademannbogen 63, 22391 Hamburg, Germany

Tel.: ++ 49/40/53 80 57 51

Fax: ++ 49/40/53 80 57 50

[schroeder@pathologie-hamburg.de](mailto:schroeder@pathologie-hamburg.de)

### ZUSAMMENFASSUNG

Der Nachweis oder Ausschluss einer Soor-Ösophagitis, der häufigsten infektiösen Erkrankung der Speiseröhre, gehört zu den Standardaufgaben der diagnostischen Histopathologie. Die Pilzhypen besiedeln überwiegend nur die obersten Schichten des ösophagealen Plattenepithels. Eine ungünstige Positionierung der Biopsiepartikel im Paraffinblock kann eine Ursache sein, weshalb die Biopsiehistologie ein falsch-negatives Ergebnis liefert. Die vorgelegte Untersuchung sollte prüfen, ob die hier bestehende diagnostische Lücke durch die Zytospin-Analyse der Fixationslösung verbessert werden kann.

Analysiert wurden von 150 konsekutiven Patienten mit klinischer Diagnose oder Fragestellung „Soor“ oder „Soor-Ösophagitis“ eingesandte Ösophagusbiopsien. Unter jeweiliger Verblindung des Pathologen hinsichtlich des Ergebnisses der

anderen Analyse wurden parallel einerseits die Gewebeproben konventionell histologisch mittels Hämatoxylin-Eosin- und PAS-Färbung sowie andererseits Zytospin-Präparationen des üblicherweise nach Entnahme der Biopsien aus dem Einsendungsrohrchen entsorgten Formalins zytologisch auf den Nachweis von Pilzhypen untersucht. Die zytologischen Präparate wurden ebenfalls PAS-gefärbt. Von den 89 Zytospin-positiven Fällen lag in 64 Fällen (71,9 %) ein positives Ergebnis der routinehistologischen Untersuchung vor. In den verbleibenden 25 Fällen (28,1 %) wurden Pilzhypen histologisch erst bei Reevaluation der Originalschnitte (n = 6) oder nach kompletter Aufarbeitung des Paraffinblocks (n = 5) gesichert oder ließen sich auch nach vollständiger Aufarbeitung des Paraffinblocks nicht nachweisen (n = 14). Nur bei einem der 61 Zytospin-negativen Untersuchungsfälle erbrachte die Histologie einen positiven Candida-Nachweis und bei allen anderen Proben ein ebenfalls negatives Resultat.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die diagnostische Sicherheit beim Nachweis eines ösophagealen Soorbefalls um mehr als ein Viertel erhöht werden kann, wenn über die routinemäßig durchgeführte Histologie der Biopsieproben hinaus auch eine zytologische Analyse der Fixationslösung vorgenommen wird.

### ABSTRACT

To confirm or to refute the diagnosis of candida oesophagitis as the most common infectious disease of the oesophagus is a standard diagnostic procedure in histopathology. The fungal hyphae colonise mainly the superficial layers of the oesophageal squamous mucosa. Tangentially cut sections of oesophageal biopsies in the paraffin block might lead to a false negative result concerning mycotic infection. The aim of this study was to investigate whether cytospin analysis of the formalin fixative in which the biopsies were stored and transported would be a tool to close the diagnostic gap.

Oesophageal biopsies from 150 consecutive patients with the clinical diagnosis or question „candida“ or „candida oesophagitis“ have been investigated. The biopsies were routinely processed and stained with haematoxylin and eosin and periodic acid-Schiff reaction. In parallel, the fixative fluid, usually disposed of after use, was processed by using a cytospin centrifuge and prepared for cytological proof of fungal hyphae.



The cytology slides were also stained with periodic acid-Schiff reaction. In this blind study, the pathologist investigating the results of one procedure was unaware of the results of the second procedure.

Out of 89 positive cytology cases, 64 cases (71,9 %) also showed a positive histology result. In the remaining 25 cases (28,1 %), fungal hyphae were seen only after re-evaluation of

the original histology slides (n = 6) or in further serial sections using the complete tissue in the block (n = 5). In 14 cases, no hyphae could be detected histologically. Only in one of the 61 cytospin-negative cases was candida seen in histology.

Our results show that diagnosing oesophageal candidiasis can be improved by more than one quarter using the formalin fixative for cytospin cytology.

## Einleitung

Im Aprilheft 2017 des American Journal of Surgical Pathology veröffentlichten Panarelli et al. [1] eine kombinierte histologische und zytologische Studie zum Nachweis von *Giardia lamblia* in Duodenalbiopsien. Bei 92 Patienten mit klinischem Verdacht auf Giardiasis erfolgte zusätzlich zur histologischen Untersuchung der formalinfixierten Biopsieproben die mikroskopische Analyse von Zytospin-Präparationen der Fixationsflüssigkeit. Zytologisch konnte *Giardia lamblia* nicht nur in allen fünf histologisch gesicherten Fällen, sondern auch in einem weiteren Fall mit negativer Histologie nachgewiesen werden. Darüber hinaus war die Zytologie sowohl hinsichtlich des Erhaltungszustandes der Protozoen als auch der im Einzelfall nachweisbaren Keimzahl der Histologie überlegen.

Im Eingangsmaterial unseres schwerpunktmäßig gastroenterologisch-pathologisch ausgerichteten Instituts mit Einsendungen überwiegend aus Hamburg und dem Hamburger Umland fällt die Giardiasis mit durchschnittlich 10 bis 15 histologisch gesicherten Fällen pro Jahr kaum ins Gewicht. Quantitativ bedeutsamer ist die Soor-Ösophagitis mit mehr als 250 entsprechenden Biopsiediagnosen pro Jahr. Da zudem der mikroskopische Nachweis von Pilzhyphen und -sporen auf und zwischen den Superfizialzellen des ösophagealen Plattenepithels störanfälliger ist als die Identifikation von zwischen den Duodenalzotten gleichsam gefangenen *Giardia lamblia*, entschieden wir uns zur Durchführung einer identisch konzipierten Vergleichsstudie zur histologischen und zytologischen Sicherung eines Candida-Befalls der Ösophagusschleimhaut. Mit dieser Studie wollten wir prüfen, ob auch für diesen Abschnitt des Gastrointestinaltrakts und für diesen Erreger die mikroskopische Analyse von Zytospin-Präparationen der bislang nach Entnahme der Biopsien aus dem Einsendungsgefäß verworfenen bzw. entsorgten Fixationsflüssigkeit die diagnostische Aussage verbessert.

## Material und Methodik

In einer auf 10 histologisch positive Soorfälle ausgelegten Pilotphase wurden die von uns standardmäßig verwendeten, mit 10 ml neutral gepufferter 4%iger Formalinlösung gefüllten Einsendungsgefäße sämtlicher Biopsieproben aus dem Ösophagus nach Entnahme der Biopsien wieder verschlossen und zunächst das Ergebnis der histologischen Untersuchung abgewartet. Im Rahmen der routinehistologischen Untersuchung wurden von den Ösophagusbiopsien auf jeweils einem Objektträger drei Hämatoxylin-Eosin- und drei PAS-gefärbte Schnittstufen von bis

zu 4 µm Dicke angefertigt und von einem Facharzt für Pathologie mikroskopiert. Soweit diagnostisch erforderlich, wurden weitere Schnitte vom im Paraffinblock verbliebenen Biopsierest angefertigt und ausgewertet.

Nach Vorliegen der ersten 10 histologisch gestellten Diagnosen einer Candida-Infektion in Ösophagusbiopsien wurde der Formalinrest dieser Fälle mittels Zytospin-Präparation auf den mikroskopischen Nachweis von Pilzen untersucht. Zu diesem Zweck wurde das im Einsendungsgefäß noch vorhandene Formalin (etwa 10 ml) in ein Spitzbodenröhrchen überführt und für 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert (Multifuge 1 s Fa. Heraeus). Nach dem Abgießen des Überstands wurde das verbliebene, etwa 500 µl messende Sediment aufgeschüttelt. Von diesem wurden zwei Proben von jeweils 80 µl in den trichterförmigen Einsatz einer Zytocentrifuge (Cytospin 3, Fa. Thermo Shandon) pipettiert und für 5 min bei 700 U/min auf einen Objektträger zentrifugiert. Die pro Histologieröhrchen resultierenden zwei zytologischen Präparate wurden PAS-gefärbt und von einem der beiden Autoren (SS oder TG) mikroskopiert.

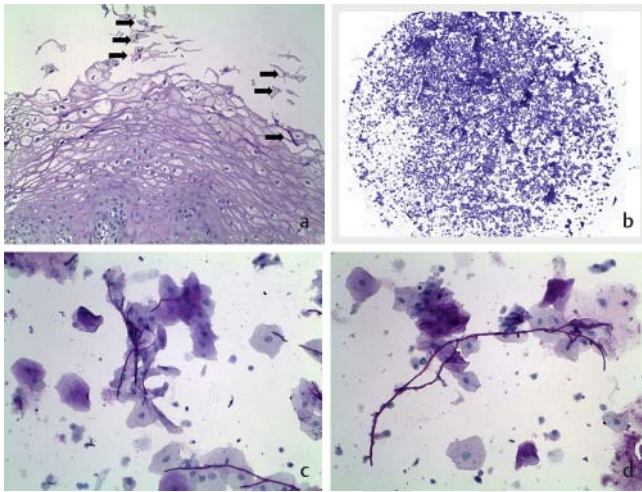
Aufgrund der in der Pilotphase identischen Befunde von Histologie und Zytologie (siehe Ergebnisse) wurden in der Studienphase 150 konsekutive Einsendungen von Ösophagusbiopsien mit entweder klinischer Fragestellung oder klinischer Diagnose „Soor“ oder „Soor-Ösophagitis“ in derselben wie oben beschriebenen Weise zunächst im Rahmen der diagnostischen Routine histologisch und danach – ohne Kenntnis des Histologiebefundes – wiederum von einem der beiden Autoren zytologisch analysiert. In Fällen mit diskrepanten Ergebnissen wurden die Schnitt- und Zytospin-Präparate nochmals von beiden Autoren mikroskopiert. Bei positiver Zytologie und auch bei erneuter Beurteilung wiederum negativer Histologie wurde das paraffinarchivierte Restmaterial der Ösophagusbiopsien in PAS-gefärbten Schnittstufen komplett aufgearbeitet und mikroskopisch analysiert.

## Ergebnisse

Mit 10 Fällen der Pilotphase und 150 Fällen der Studienphase wurden insgesamt 160 Proben kombiniert ausgewertet. Von 5 Patienten lagen zusätzlich Ausstrichpräparate einer Bürstenzytologie der Ösophagusschleimhaut vor.

In 157 der 160 Fälle (98 %) zeigte die Doppelbestimmung der Zytospin-Präparation ein identisches Ergebnis (positiv n = 89, negativ n = 61).

Bei allen 10 Fällen der Pilotphase mit histologisch nachgewiesener Candida-Besiedlung des ösophagealen Plattenepithels (► **Abb. 1a**) waren auch in den Zytospin-Präparationen des asser-



► **Abb. 1** Histologischer und zytologischer Candida-Nachweis: **a** Histologie einer Ösophagusbiopsie: Mit Pfeilen markiert überwiegend quer und nur in einem Fall (rechts unten) längs getroffene Pilzhyphen zwischen teilweise bereits in Ablösung begriffenen oberflächlichen Plattenepithelien, PAS x400; **b** Lupen-mikroskopisches Bild der Zytospin-Präparation vom nach Entnahme der Biopsiepartikel zentrifugierten Formalinrest, PAS x2; **c** Detailvergrößerung von **b**: Lange Pilzfäden zwischen einzeln oder in Gruppen desquamierten plattenepithelialen Superficialzellen, PAS x400; **d** Ausstrichpräparat einer ösophagealen Bürstenzytologie mit gleichartigem Aspekt wie für die Zytospin-Präparation beschrieben, PAS x400.

vierten Formalinrests (mit jeweils identischem Ergebnis in der Doppelbestimmung) eindeutig Pilzhyphen nachweisbar (► **Abb. 1b, c**). Sowohl zytologisch wie histologisch fanden sich abhängig vom Ausmaß der Besiedlung polymorphe, einzeln zwischen den Plattenepithelien liegende und teilweise auch büschelförmige Pseudomyzelien ausbildende intensiv PAS-positive Pilzfäden.

Die Korrelation der zytologischen und histologischen Ergebnisse der Studienphase zum Candida-Nachweis ist in ► **Tab. 1** zusammengefasst. Von den 89 Zytospin-positiven Fällen lag in 64 Fällen (71,9%) ein positives Ergebnis der routinehistologischen Untersuchung vor. In 6 Fällen (6,7%) wurden Pilzhyphen histologisch erst bei – unter Kenntnis der positiven Zytologie – nochmaliger mikroskopischer Beurteilung der initial angefertigten Schnittpräparate und in 5 Fällen (5,6%) nach Auswertung zusätzlicher Schnittstufen vom komplett aufgeschnittenen Paraffinblock nachgewiesen. Bei den verbleibenden 14 Fällen (15,7%) blieb die Histologie auch nach diesem erhöhten Aufwand negativ.

Nur bei einem der 61 Zytospin-negativen Untersuchungsfälle erbrachte die Histologie einen positiven Candida-Nachweis. Alle anderen 60 Fälle waren auch in der Histologie negativ.

Die im Studienzeitraum von einer der einsendenden Kliniken bei fünf Patienten zusätzlich zu den Ösophagusbiopsien gewonnenen büstenzytologischen Ausstrichpräparate zeigten alle ein positives Resultat (► **Abb. 1d**). In drei Fällen waren Zytospin-Präparation und Biopsiehistologie – letztere bei einem Fall erst nach Auswertung zusätzlicher Schnitte vom Paraffinrest – positiv. Bei den beiden anderen Fällen waren Pilzhyphen nur in den Ausstrich-

präparaten der Bürstenzytologie, jedoch nicht in Zytospin-Präparaten und in den komplett in Schnittstufen aufgearbeiteten Biopsieproben nachweisbar.

## Diskussion

Bei bis zu 20% der Bevölkerung besiedeln Hefepilze der Spezies *Candida albicans* als Kommensale die Ösophagusschleimhaut. Bedingt durch verschiedene Faktoren wie Tumorerkrankungen, Diabetes mellitus, Behandlung mit Steroiden, Breitspektrumantibiotika oder Immunsuppressiva, HIV-Infektion, Mangelernährung, Bestrahlung oder Motilitätsstörungen des Ösophagus kann *Candida albicans* pathogen werden und (sehr viel häufiger als andere Spezies wie *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* oder *C. glabrata*) eine Soor-Ösophagitis, die häufigste Form einer Infektion der Speiseröhre, verursachen [2, 3]. Es gehört damit zu den Standardaufgaben eines Pathologen, bei der histologischen Diagnostik von Ösophagusbiopsien – ob vom einsendenden Endoskopiker erfragt oder nicht – neben anderen Erkrankungen auch eine mögliche Pilzinfektion auszuschließen oder zu sichern. Die von uns vorgelegte Untersuchung belegt, dass in diesem Punkt die diagnostische Sicherheit um mehr als ein Viertel erhöht werden kann, wenn über die routinemäßig durchgeführte Histologie der Biopsieproben hinaus auch eine zytologische Analyse der Fixationslösung vorgenommen wird.

Es unterliegt dem Zufall, wie die zumeist flachen, häufig keine stromalen Bestandteile einschließenden Biopsiepartikel von der Oberfläche der Ösophagusschleimhaut beim Gießen der Paraffinblöcke zu liegen kommen und ob in ausreichendem Anteil oder überhaupt Plattenepithelstreifen orthograd getroffen werden. Die Trimmung der Biopsien im Paraffinblock ist von geringerer Bedeutung bei Prozessen, bei denen – wie im Fall der eosinophilen Ösophagitis – alle Epithelschichten entzündungszellig durchsetzt oder – wie bei der Refluxösophagitis – die entzündlichen Zellinfiltrate von diagnostisch relevanten strukturellen Veränderungen des Plattenepithels begleitet sind, aber essenziell bei der Soor-Ösophagitis, da die Pilzkolonisation in der Regel auf die obersten Schichten des Plattenepithels beschränkt ist. So ist verständlich, dass im ungünstigsten Fall bei gleichsam kopfüber eingebetteten Proben die mykotisch besiedelten Superficialzellen schon beim Anschneiden des Blocks komplett weggeschnitten werden, in den für die mikroskopische Analyse aufgezogenen tieferen Schnittstufen nicht mehr enthalten sind und somit ein falsch-negatives Ergebnis erzielt wird. Diese Situation lag vermutlich bei einigen der 14 Fälle mit in der Zytospin-Präparation positivem und histologisch auch in den Nachschnitten negativem Pilznachweis vor. Bei den 5 in der Primärhistologie negativen und bei der weiteren Aufarbeitung positiven Fällen gelangten mykotisch besiedelte superfizielle Keratinozyten erst in den tieferen Stufen in den Anschnittsbereich des Paraffinblockes. In den 6 primär als negativ und bei Reevaluation der Originalschnitte positiv befundenen Fällen konnte das Übersehen der Infektion retrospektiv durch eine Maskierung der Pilzhyphen durch dichte entzündliche Infiltrate oder durch Schleimfahnen ebenfalls im Biopsiematerial eingeschlossener gastrischer Mukosa erklärt werden.

► **Tab. 1** Zytologischer und histologischer Candida-Nachweis (Studienphase).

Zytospin-Präparation	n	Biopsiehistologie	n	Bürstenzytologie	n
positiv	89	primär positiv	64	positiv	2
		bei Reevaluation positiv	6		
		in Nachschnitten positiv	5		
negativ	61	auch in Nachschnitten negativ	14	positiv	1
		negativ	60	positiv	2
		positiv	1		
Summe	150		150		5

In 25 von 89 Fällen (28,1 %) konnte der Pilzbefall histologisch nicht oder erst nach wegen eines positiven Zytospin-Befunds veranlasstem zusätzlichem Untersuchungsaufwand bestätigt werden. Die um mehr als ein Viertel höhere Rate erklärt sich damit, dass gerade Zellen der im Fall einer Candida-Infektion von Pilzfäden durchsetzten oberflächlichen Epithelschichten sich am ehesten aus dem Verband der Keratinozyten lösen, in die Fixationslösung desquamieren und hier gewissermaßen angereichert sehr viel häufiger als Zellen aus den tieferen Schichten des Plattenepithels nachweisbar sind. Zudem sind die Pilzfäden in histologischen Schnitten bisweilen nur im wenige Mikrometer durchmessenden Querschnitt, in der Zytospin-Präparation aber obligat im um ein Vielfaches größeren Längsschnitt erfasst. Die beiden vorgenannten Effekte gelten in identischer Weise für die Bürstenzytologie, bei der ausschließlich Zellen aus den obersten Lagen des Plattenepithels abgetragen werden, bei der gegebenenfalls vorhandene Pilzhyphen in ihrer gesamten Länge im Ausstrichpräparat sichtbar sind und die bei 2 der 5 in unserer Studie eingeschlossenen Patienten einen positiven Pilznachweis sogar bei negativer Zytospin-Präparation erbrachte. Die Bürstenzytologie scheint damit die sicherste Methode zur morphologischen Sicherung einer klinisch bzw. endoskopisch vermuteten Pilzbesiedlung der Ösophagasmukosa zu sein. In Anbetracht der nur geringen klinischen Akzeptanz dieser Technik ist die hier von uns vorgestellte Zytospin-Präparation aber ein geeignetes Instrument, die diagnostische Lücke bei der Sicherung einer Pilzinfektion des Ösophagus zumindest einzuengen. Aufgrund der von uns erhobenen Befunde wird in unserem Institut ab sofort bei sämtlichen

Ösophagusbiopsien mit klinisch mitgeteiltem Soorverdacht neben der Histologie auch die Zytospin-Präparation mikroskopisch ausgewertet, wobei wir wegen der in 98 % konkordanten Befunde der Doppelbestimmungen jetzt für jedes Biopsiegefäß nur noch eine Zytologie anfertigen und auswerten. Die Histologie bleibt aber auch bei der Frage nach einem Pilzbefall der Speiseröhre das Standardverfahren der morphologischen Diagnostik – nicht, weil bei einem Patienten unserer Serie die Histologie positiv und die Zytospin-Präparation negativ war, sondern weil nur dieses Verfahren sicher zwischen einer blanden Pilzkolonisation und einer floriden Soor-Ösophagitis unterscheiden und gegebenenfalls weitere, gegebenenfalls klinisch noch bedeutsamere pathologische Veränderungen identifizieren kann.

#### Interessenkonflikt

Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

#### Literatur

- [1] Panarelli NC, Gobara N, Holda RS et al. Cytology preparations of formalin fixative aid detection of giardia in duodenal biopsy samples. *Am J Surg Pathol* 2017; 41: 570–574
- [2] Lai KK, Lamps LW. Infectious disorders of the upper gastrointestinal tract (excluding *Helicobacter pylori*). *Diagn Histopathol* 2017; 23: 73–83
- [3] Mahadeva U. Persisting and emerging areas of diagnostic difficulty in the histopathology of infectious disease of the gastro-intestinal tract. *Diagn Histopathol* 2017; 23: 397–404