

J. Bauch H. Halsband K. Hempel M. Rehner H. W. Schreiber

Manual Ambulante Chirurgie I

Allgemeines, perioperatives Management
Behandlungsverfahren
Operationstechniken im Erwachsenen- und Kindesalter
Qualitätsmanagement
Gesetze und Regelwerke



GUSTAV FISCHER

Sonderdruck aus:

J. Bauch • H. Halsband • K. Hempel •
M. Rehner • H. W. Schreiber

Manual Ambulante Chirurgie I

Kapitel 3.6:
**Asservierung histologischen und
zytologischen Untersuchungsmaterials**



Stuttgart Jena Lübeck Ulm

3.6 Asservierung histologischen und zytologischen Untersuchungsmaterials

S. Schröder

3.6.1 Histologische Untersuchungen

Nativmaterial

Die histologische Diagnostik erfolgt zu weit über 90 % an *Paraffinschnitten* routinemäßig fixierten und eingebetteten Gewebes.

Die selteneren Untersuchungen an unfixiertem Gewebe mittels *Gefrier-(Kryostat-)schnitten* sind indiziert für:

- Intraoperative *Schnelluntersuchungen*
- Diagnostik von *Muskel- und Nervenbiopsien*
- Direkte *Immunfluoreszenz* an Haut- und Schleimhautbiopsien.

Schnellschnittuntersuchung

Zur *Schnellschnittuntersuchung* müssen Gewebeproben trocken in einem Glas- oder Kunststoffgefäß bzw. -beutel transportiert werden, der bei längeren Transportwegen und -zeiten in ein mit Eiswürfeln gefülltes Behältnis einzubringen ist.

Ein Gefrieren der Proben ist zu vermeiden!

Aus diesem Grund ist den Eiswürfeln ggf. etwas Wasser beizugeben und keinesfalls Trockeneis zu verwenden.

Schnellschnittuntersuchungen

- Trockener Transport bei unter 1/2 Stunde Dauer
oder
- Gekühlter Transport (+ 4 °C) bei längerer Dauer
Nicht gefrieren ! Kein Trockeneis verwenden !

Tab. 3.26: Transportbedingungen für Schnellschnittuntersuchungen. Die angegebenen kritischen Zeitbereiche sind Näherungsschätzungen. Es empfiehlt sich die Berücksichtigung von Sicherheitsreserven.

Grundsätzlich wird der nach Anfertigung von Gefrierschnitten übrigbleibende Rest der im Kryostaten aufgefrorenen Gewebeprobe aufgetaut, fixiert, eingebettet und an Hand von Paraffinschnitten nachuntersucht.

Wegen der erheblichen Temperatursprünge bei diesen Prozeduren ist die Gewebserhaltung hier deutlich schlechter als bei primär fixiert eingesandten Proben. Gelegentlich sind so wichtige mikroskopische Detailinformationen nicht mehr zu gewinnen.

Sofern möglich, sollten die nativ zur Schnellschnittuntersuchung übersandten Proben so groß sein, daß beim Zuschnitt des verdächtigen Gewebes im pathologischen Labor ein Teil zusätzlich direkt in Fixationslösung gegeben werden kann.

Reicht die Probe für eine Teilung nicht aus, wäre vor Beendigung des Eingriffs die nochmalige Entnahme einer fixiert einzusendenden Probe ratsam, z.B. zur definitiven Absicherung beim Schnellschnitt-Nachweis eines malignen Non-Hodgkin-Lymphoms mit Indikation zum Abbruch eines Eingriffs.

Muskel- und Nervenbiopsien

Die umfangreiche morphologische Diagnostik von Muskel- und Nervengewebe schließt histologische, elektronenmikroskopische und histochemische Untersuchungstechniken ein. Dazu müssen die Proben neben der Standardfixation (s. Tab. 3.28) auch in gepuffertem Glutaraldehyd sowie schockgefroren asserviert werden.

Sofern diese komplexen Anforderungen in der Praxis oder Ambulanz nicht zu leisten sind, können sie innerhalb einer Frist von 1 bis max. 2 Stunden im pathologisch-anatomischen Labor bei Beachtung definierter Bedingungen nachgeholt werden. Dies dürfte das Vorgehen der Wahl für die ambulante Versorgung sein. Zu diesen Bedingungen gehört zur Vermeidung von Artefakten der Transport des Biopsats in einer feuchten Kammer in einer Kühlbox. Der unmittelbare Kontakt mit Flüssigkeiten inkl. Kochsalzlösung und ein Gefrieren der Proben ist dabei zu vermeiden (D. STAVROU, pers. Mitteilung).

Asservation von Muskel- und Nervenbiopsien

- Standardfixation (Formalin),
- Fixation in gepuffertem Glutaraldehyd und
- Schockfrostung
oder
- Feuchte Kammer ohne direkten Flüssigkeitskontakt, in Kühlbox (maximale Transportdauer 1 – 2 Std.)

Tab. 3.27: Asservation und wählbare Transportmedien/-bedingungen für Biopsien aus Muskel- und Nervengewebe. Werden diese Kautelen nicht berücksichtigt, sind diagnostisch wichtige morphologische Untersuchungsverfahren nicht durchführbar.

Immunfluoreszenz

Hautbiopsien für eine *direkte Immunfluoreszenz* sollten ebenfalls gekühlt versandt werden. Dies kann jedoch direkt in gepufferter isotonischer Kochsalzlösung geschehen.

Fixierte Proben

Die Möglichkeiten zur Fixation von Gewebe sind zahlreich. Die Verwendung von *Formalin* (Formol = wässrige Lösung des Gases Formaldehyd) ist ein *praktikabler Kompromiß* für die Praxis. Es ist preiswert herzustellen, die Gewebserhaltung ist auch bei längerer Verweildauer im Fixans nicht beeinträchtigt und die Option für die Durchführung der meisten Spezialfärbungen und immunhistologischen Techniken bleibt offen.

Zu empfehlen ist die Fixation der Gewebeproben in etwa 4 %iger Formalinlösung. Sie wird durch Verdünnung der 30 – 40 %igen konzentrierten Stammlösung mit Leitungswasser im Verhältnis 1:10 (1 Teil Formol und 9 Teile Wasser) hergestellt [1]. Neutral gepuffertes Formalin ist nur ausnahmsweise bei speziell geplanten histochemischen Untersuchungen erforderlich.

Da Formalin bei der Fixierung chemisch verbraucht wird, sollte bei der Wahl der Fixations- und Transportgefäße ein Raumverhältnis von etwa 10 Teilen Formalinlösung auf 1 Teil Gewebe gesichert sein [8, 9].

Standardfixation

etwa 4 %ige Formalin-Lösung

- *Herstellung:* 1 Teil 30 – 40 %ige Formalin-Stammlösung auf 9 Teile Wasser
- *Notwendige Volumenrelation:* 10 Teile Lösung auf 1 Teil Gewebe!

Tab. 3.28: Die Standardfixation genügt auch Anforderungen für die meisten immunhistologischen Untersuchungen (z.B. Analyse der Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren beim Mammakarzinom). Ein häufiger Fehler ist die Wahl zu kleiner Transportbehälter, bei denen die notwendige Volumenrelation nicht gewahrt wird!

Lymphknotenhistologie

Auch für die Lymphomdiagnostik an exstirpierten *Lymphknoten* wird die Formalin-Fixation in der Regel als ausreichend angesehen.

Zusätzlich kann eine zytologische Untersuchung von luftgetrockneten Tupfpräparaten empfohlen werden. Dazu werden die frischen Schnittflächen des mit dem Skalpell eröffneten Lymphknotens auf einen gut entfetteten Objektträger getupft und fixiert (s.u.).

Eine routinemäßige Asservation schockgefrorenen Lymphknotengewebes kann nicht empfohlen werden. Nur ein sehr kleiner Anteil der Non-Hodgkin-Lymphome bedarf zur endgültigen Klassifikation der immunhistologischen Analyse am Kryostatschnitt [4].

Immunhistologie

In jüngster Zeit konnte das Spektrum der an fixierten Gewebeproben durch *Immunhistologie* nachweisbaren Antigene deutlich ausgeweitet werden. Dies wurde erreicht durch die Entwicklung paraffingängiger Antikörper (z.B. MIB-1 gegen das Proliferations-assoziierte Antigen Ki-67) und die Einführung spezieller Techniken zur Demaskierung von durch Formalinfixation verdeckten Antigenen (Antigen retrieval). Technisch geschieht dies durch Mikrowellenbehandlung [11] oder feuchtes Autoklavieren [12].

Östrogen- und Progesteron-Rezeptornachweis

Auch der Nachweis von *Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren* im Rahmen der Diagnostik des Mammakarzinoms (siehe Kapitel 5.6) kann danach zuverlässig am formalinfixierten Gewebe erzielt werden [14]. Der Nutzen dieses Verfahrens liegt in der Möglichkeit eines Rezeptornachweises an Gewebeproben, die nicht im Schnellschnitt untersucht wurden oder bei denen am Schnellschnitt keine Karzinomdiagnose gestellt werden konnte und bei denen daher die Asservation schockgefrorenen Materials unterblieb. Wegen des erheblich geringeren logistischen Aufwands (keine Kühlkette erforderlich) wird daher bereits jetzt von vielen Pathologen die Immunhistologie für Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren generell und ausschließlich an Paraffinschnitten formalinfixierter Gewebeproben durchgeführt.

Topographische Orientierung

Alle Gewebeproben oder vollständige Exzisate, bei denen nach Beurteilung des Tumorrands und der Sicherheitszonen eine Nachresektion notwendig werden könnte, sollten unmittelbar nach der Entnahme mit einer Markierung versehen werden.

Bei *Hautexzisaten* oder hautbedeckten Weichteilexzisaten genügt *eine* Fadenmarkierung. Bei anderen Pro-

ben (z.B. Mammagewebe ohne Hautanteil) wären *zwei* farblich oder z.B. durch Anbringen einer unterschiedlichen Anzahl von Knoten *differente Fadenmarkierungen* erforderlich. Ihre Lage (z.B. ventral, kranial u.ä.) ist auf dem Materialbegleitschein anzugeben. Eine ggf. erforderliche Farbstoffmarkierung der Resektionsränder des so topographisch orientierten Präparates wird üblicherweise im pathologischen Labor unmittelbar vor der Gewebseinbettung vorgenommen.

3.6.2 Zytologie

Die Form der Asservierung zytologischen Untersuchungsmaterials ist abhängig von der Art der zu untersuchenden Proben (Abstriche von inneren oder äußeren Oberflächen, Ausstriche von Punktaten aus soliden Geweben, Punktionsflüssigkeiten, z.B. aus Zysten oder serösen Höhlen) und der Art der daran anzuwendenden Färbungen.

Exfoliativ- und Punktionszytologie

Abstrichpräparate sowie Punktatausstriche aus soliden Geweben (z.B. Schilddrüse, Mamma) werden – abhängig von der geplanten Färbemethode – *luftgetrocknet* oder in *Alkohol fixiert*. Generell sollten für die Ausstriche *Objektträger mit Mattrand* verwendet werden. Bei ihnen wird eine mit Bleistift vorgenommene Beschriftung durch die später angewendeten Fixierungs- und Färbelösungen nicht gelöscht [2].

Voraussetzung für die Durchführung von Färbungen nach Papanicolaou, mit Hämatoxylin-Eosin u.a. ist die *sofortige Fixation der noch feuchten Ausstriche* für mindestens 15 Minuten in Küvetten mit 96 %igem Alkohol oder mit einem Sprayfixativ. Letzteres Verfahren ist wegen der einfachen Handhabung für ambulante Eingriffe in chirurgischen Praxen und Ambulanzen besonders geeignet. Ein Antrocknen der Ausstriche vor der Fixation ist wegen erheblicher Artefakte auf jeden Fall zu vermeiden. Nach Fixation läßt man die Präparate an der Luft trocknen. Sie sind nach etwa einer Stunde trocken und können für den Versand in Objektträgerboxen verpackt werden [1, 2, 3, 6].

Alternativ zur Feuchtfixation mit anschließender Lufttrocknung können bei entsprechenden Transportmöglichkeiten die Ausstriche bis zur Ankunft im pathologischen Labor in den alkoholgefüllten Küvetten verbleiben. In diesen Fällen erfolgt die Färbung ohne zwischenzeitliche Trocknung [3].

Für die Durchführung einer *May-Grünwald-Giemsa (MGG)-Färbung* z.B. für hämatologische Analysen werden die Präparate *luftgetrocknet*. Hier entfallen zwangsläufig die o.g. Fehlermöglichkeiten durch Antrocknung der Punktatausstriche vor Alkoholfixation.

Diese luftgetrockneten Ausstriche sind versandfähig und können ungefärbt unbegrenzt aufbewahrt werden [2].

Lufttrocknung und MGG-Färbung sind keinesfalls nur hämatologischen Fragestellungen vorbehalten. Sie werden erfolgreich auch in der Diagnostik von Punktaten solider Organe eingesetzt und teilweise der Feuchtfixation vorgezogen [2]. Die Wahl des Verfahrens hängt von der persönlichen Erfahrung und Präferenz des Zytopathologen ab. Der einsendende Chirurg sollte vorab die notwendigen Informationen einholen.

Asservierung von Punktatausstrichen

- Lufttrocknung (für MGG-Färbung)
oder
- Feuchtfixation der Objektträger (für andere Färbungen)
 - durch Eintauchen in 96 %ige Alkohollösung (15 Min.)
 - oder durch Sprayfixativ
 - danach: Lufttrocknung über etwa 1 Stunde.

Tab. 3.29: Verfahren zur Asservierung von Punktatausstrichen.

Wegen der beiden Methoden eigenen Vor- und Nachteile hinsichtlich der Beurteilbarkeit zytoplasmatischer und nukleärer Details sind Lufttrocknung und Alkoholfixation als komplementär zu werten und ggf. nebeneinander am gleichen Material einzusetzen [5, 6].

Für die Durchführung *immunzytologischer Untersuchungen* sind beide Verfahren vergleichbar gut geeignet [7]. Bei luftgetrockneten Präparaten ist offenbar die Immunreaktivität von Oberflächenantigenen, bei Alkoholfixation die von zytoplasmatischen Antigenen besser erhalten [2]. In beiden Fällen wird im Labor vor der Antikörperüberschichtung eine Nachfixation mit Azeton erforderlich. Dies führt zu einer verbesserten Durchgängigkeit der bei der Lufttrocknung intakt gebliebenen Zellmembranen.

Asservierung von Punktionsflüssigkeiten

Generell sollten Punktionsflüssigkeiten nativ und zum Schutz gegen eine Kontamination durch Bakterien gut verschlossen so rasch wie möglich an das untersuchende Labor weitergeleitet werden. Ist dies nicht innerhalb weniger Stunden (kritische Grenze ca. 3 Stunden) gewährleistet, kann der einsetzende Prozeß der Zytolyse durch Kühlung verzögert werden.

Ein Gefrieren der Proben ist unbedingt zu vermeiden.

Punktionsflüssigkeiten aus Zysten (z.B. Schilddrüse, Mamma) oder serösen Höhlen (Aszites, Pleuraerguß) sollten zur Verhinderung einer möglichen Gerinnung mit einem *Antikoagulans* versetzt werden. Geeignet hierfür sind *Heparin* (Dosierung: 1 mg oder 100 IE auf 10 ml Punktat), *EDTA* (Dosierung: 10 mg auf 10 ml Punktat) oder *Natriumzitat* (Dosierung: 20 mg auf 10 ml Punktat) [1, 13]. Diese vorsorgliche Maßnahme ist bei Punktionsflüssigkeiten aus Gelenken nicht erforderlich.

Die Punktionsflüssigkeiten werden im Labor in Abhängigkeit von Punktatvolumen und Zelldichte unterschiedlich behandelt. Neben direkten Ausstrichen sind zusätzliche Zentrifugationen, z.B. Zytospin®, oder Filtrationen möglich. Sofern die Flüssigkeiten unfixiert versandt werden, können die damit gewonnenen Ausstriche luftgetrocknet und nach MGG gefärbt oder – noch feucht – alkoholfixiert und anderen Färbungen inkl. immunzytologischer Analysen unterzogen werden [1, 3].

Nur wenn in Ausnahmesituationen wegen zu langer Transportzeiten eine rasche Weiterbearbeitung der Punktionsflüssigkeit unmöglich und ein sicher gekühlter Transport nicht garantiert werden kann, sollte entsprechend den Empfehlungen von Papanicolaou mit einem gleichen Volumen 50 %igen Alkohols fixiert werden [8, 13]. In diesen Situationen entfällt die Möglichkeit einer Färbung nach MGG.

Punktatasservierung aus Körperhöhlen und Zysten

Zur Verhinderung einer Gerinnung (bei Gelenkpunktaten nicht erforderlich):

- Heparin-Zusatz (1 mg oder 100 IE auf 10 ml Punktat)
oder
- EDTA-Zusatz (10 mg auf 10 ml Punktat)
oder
- Natriumzitat-Zusatz (20 mg auf 10 ml Punktat)
- Kühlkette bei +4 °C bei Transportdauer bis max. etwa 12 Stunden
in Ausnahmefällen (s. Text) alternativ:
- Fixation 1:1 mit 50 %iger Aethanol-Lösung bei längerer Transportdauer

Tab. 3.30: Bei Punktaten aus Körperhöhlen (Pleuraerguß, Aszites) oder Zysten (Schilddrüse, Mamma) besteht die Gefahr einer Gerinnung. Um für die zytologische Analyse notwendige Sedimentationsverfahren zu ermöglichen, sollte vorsorglich eine der angegebenen Gerinnungshemmungen eingesetzt werden.

Literatur

- [1] Böck P: Romeis Mikroskopische Technik, 17. A. Urban&Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore 1989
- [2] Droese M: Punktionszytologie der Schilddrüse. Atlas und Handbuch. 2. A. Schattauer, Stuttgart-New York 1995
- [3] Keebler CM: Cytopreparatory Techniques. In: Bibbo M (Ed.): Comprehensive Cytopathology. W.B.Saunders, Philadelphia 1991 (S. 881-906)
- [4] Lennert K, Feller AC: Histopathologie der Non-Hodgkin-Lymphome (nach der aktualisierten Kiel-Klassifikation), 2. A. Springer, Berlin-Heidelberg 1990
- [5] Linsk JA, Franzen S: Clinical Aspiration Cytology, 2nd Ed. J.B.Lippincott, Philadelphia 1989 (S.3)
- [6] Orell SR, Sterrett GF, Walters MN, Whitaker D: Manual and Atlas of Fine Needle Aspiration Cytology. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1992
- [7] Osborn M, Domagala W: Immunocytochemistry. In: Bibbo M (Ed.): Comprehensive Cytopathology. W.B.Saunders, Philadelphia 1991 (S. 1011-1051)
- [8] Remmele W: Einführung in die bioptische Diagnostik. In: Remmele W (Hrsg.): Pathologie, Bd. 1. Springer, Berlin-Heidelberg 1984 (S. 15-35)
- [9] Rosai J: Gross Techniques in Surgical Pathology. In: Rosai J (Ed.): Ackerman's Surgical Pathology, 7th Ed. Mosby, St. Louis (S. 13-29)
- [10] Schröder JM: Skelettmuskulatur. In: Remmele W (Hrsg.): Pathologie, Bd. 4. Springer, Berlin-Heidelberg 1984 (S. 419-478)
- [11] Shi SR, Key ME, Kalra KL: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. J Histochem Cytochem 39 (1991) 741-748
- [12] Shin RW, Iwaki T, Kitamoto T, Tateishi J: Hydrated autoclave pretreatment enhances TAU immunoreactivity in formalin-fixed normal and Alzheimer's disease brain tissue. Lab Invest 64 (1991) 693-702
- [13] Takahashi M: Color Atlas of Cancer Cytology. 2nd Ed. Thieme, Stuttgart-New York 1981
- [14] Wilkens C, Beck T, Weikel W, Brumm C, Pollow K: Hormonrezeptorbestimmung am Mammakarzinomgewebe. Pathologie 16 (1995) 256-261