

Aus dem Institut für Pathologie- Funktionsbereich Cytopathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Einsatz adjuvanter Methoden in der Perikardergusszytologie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Kristina Haastert

2015

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld
Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Malte Kelm

Für meine Familie

Zusammenfassung

In der internationalen Fachliteratur gibt es nur spärliche Aussagen über den Einfluss immunzytochemischer Untersuchungsmethoden auf die Treffsicherheit der Perikardergusszytologie. Daher ist es Ziel dieser Arbeit den immunzytochemischen Einfluss an einem aussagekräftigen Patientenkollektiv zu untersuchen und außerdem die spezifischen Ätiologien sowohl der benignen als auch malignen Ergüsse darzustellen.

Hierzu fand eine retrospektive Analyse von Perikardergüssen der Jahre 2002 bis 2011 statt. Die Gesamtzahl der in diesem Zeitraum punktierten und konventionell zytologisch untersuchten Patienten belief sich auf 456, dabei wurden die Proben von 84 Patienten immunzytochemisch weiter untersucht (=18,4%). Von den 84 Patienten erfüllten sechs die Einschlusskriterien für das *Follow-Up* nicht, da die Datenerhebung in den überweisenden Krankenhäusern und Praxen erfolglos blieb; bei zwei weiteren Patienten waren für eine immunzytochemische Analyse zu wenige Zellen vorhanden. Die Gesamtzahl der in der vorliegenden Studie eingeschlossenen Patienten beläuft sich somit auf 76 Patienten, von denen 79 Proben untersucht wurden. Außerdem wurde im Rahmen der Studie bei drei Patienten nachträgliche Untersuchungen bzw. Betrachtungen vorgenommen, nachdem die zur originalen Diagnostik durchgeführten immunzytochemischen Färbungen teilweise zum klinischen Verlauf diskrepante Ergebnisse erbracht hatten. Bei der Verwendung der Immunzytochemie kommen zwei grundsätzliche Konstellationen zutragen:

Zum einen gibt es Fälle (n=29), bei denen man Tumorzellen für möglich hält, aber sie konventionell-zytologisch nicht beweisen kann; hier wird die Immunzytochemie zum Beweis oder Ausschluss von Tumorzellen eingesetzt. Üblicherweise geschieht dies durch die Anwendung der immunzytochemischen Marker BerEP4 und HEA 125. In diesem Kollektiv konnte für die Immunzytochemie eine Sensitivität von 87,5% und Spezifität von 69,2% ermittelt werden. Die Gesamttreffsicherheit erzielte einen Wert von 79,3%. Die Sensitivität konnte somit um 43,7 und die Gesamttreffsicherheit um 17,2 Prozentpunkte gegenüber der konventionellen Diagnostik angehoben werden. Darüber hinaus wurden 19 Fälle, die zytologisch als „zweifelhaft“ eingestuft worden waren, isoliert betrachtet. Von den 19 Fällen erwiesen sich im *Follow-Up* 10 als tatsächlich „negativ“, 9 Fälle als „positiv“. Von den 9 malignen Ergüssen wurden durch immunzytochemische Marker 8 Proben als „positiv“ erkannt. Insgesamt ergab sich daraus für die adjuvante Diagnostik eine Sensitivität von 88,9% und Spezifität von 80%. Die Gesamttreffsicherheit beträgt 84,2 %.

Zum anderen gibt es Fälle (n=47), bei denen Tumorzellen sicher sind, der Kliniker sich aber Gewissheit über den *Primarius* verschaffen möchte. Bei klinisch bestehendem Verdacht auf einen Primärtumor können hier relativ spezifische Marker angewandt werden. Liegt ein *Cancer of unknown primary* (CUP) vor, so ist ein breiterer Markereinsatz indiziert.

Innerhalb dieser Subkohorte konnte zu 89,4% eine richtige Typisierung vorgenommen werden, dabei wurden 96,7% aller Bronchialkarzinome (n=30) richtig typisiert. Für die drei häufigsten *Primarii* (Bronchialkarzinome, Mammakarzinome und Mesotheliome) konnte eine Treffsicherheit von 97,2% erzielt werden.

Betrachtet man die Ätiologie, konnte gezeigt werden, dass 82% der Perikardergüsse durch sekundäre Neoplasien entstanden sind. Dabei erwies sich im Gesamtkollektiv die Lunge mit 56,5%, gefolgt von Mamma mit 14,5% und Mesotheliomen mit 6,5% als die drei häufigsten *Primarii*.

Aus den Ergebnissen resultiert, dass sich der Einsatz der Immunzytochemie als adjuvante Methode sowohl zur Bestimmung der Dignität eines Perikardergusses und zur weiteren Abklärung zytodiagnostisch „zweifelhafter“ Fälle als auch zur Identifizierung eines Primärtumors eignet. Die Immunzytochemie ist ein klinisch bedeutsamer Gewinn zur Erhöhung der Treffsicherheit der Perikardergusszytologie.

Abkürzungsverzeichnis

In der Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Abb.	Abbildung	M	Mann
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex Methode	MGG	May-Grünwald-Giemsa
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>	Min.	Minute
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol	ml	Milliliter
AgNOR	Argyrophile Nukleolus organisierende Regionen		
APAAP	Alkalische-Phosphatase- Anti-Alkalische- Phosphatase	MRT	Magnetresonanztomographie
BCL 2	<i>B-cell lymphoma 2</i>	n	Anzahl
C°	Grad Celsius	PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
Ca 125	<i>Cancer Antigen 125</i>	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
CA-72-4	<i>Carbohydrate Antigen</i>	PCR	Polymerasekettenreaktion
CD	<i>Cluster of differentiation</i>	pH	potentia hydrogenii
CK	Zytokeratin	PR	Progesteron Rezeptor
Cm/ cm²	Zentimeter / Quadratzenimeter	PSA	Prostata spezifisches Antigen
CT	Computertomographie	TRIS	tris (hydroxymethyl) aminomethan
CUP	<i>Cancer of unknown primary</i>	TTF	Thyroidaler Transkriptionsfaktor
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	s./s.u.	siehe/siehe unten
dl	Deziliter	Vgl.	vergleiche
EL	Evidenzlevel	WK	Wertungskategorie
EMA	epitheliales Membranantigen	WT	Wilms-Tumor-Antigen
ER	Östrogen-Rezeptor		
et al.	Et alii		
F	Frau		
g	Gramm		
GP	Glykoprotein		
Her-2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>		
HHU	Heinrich Heine Universität		
kDa	Kilo-Dalton		
LAB-Methode	<i>Labeld-Avidin-Biotin</i> Methode		
LCA	Allgemeines Leukozytenantigen		

Inhaltverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis.....	II
Inhaltverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Einführung.....	1
1.2 Perikardergüsse.....	3
1.2.1 Anatomie und Physiologie	3
1.2.2 Ätiologie und Pathogenese der Ergussbildung	4
1.2.3 Klinik und Diagnostik.....	7
1.2.4 Therapie	11
1.3 Zielsetzung	12
2 Material und Methode.....	15
2.1 Patientenkollektiv	15
2.1.1 Auswahl der Patientenpopulation	15
2.1.2 Einschlusskriterien	15
2.1.3 Geschlechterverteilung	17
2.1.4 Altersverteilung.....	17
2.2 Materialaufbereitung.....	18
2.2.1 Klinische Vorgehensweise der Materialgewinnung	18
2.2.2 Herstellung der Ausstrichpräparate für die Ergusszytologie	19
2.2.3 Zytologische Kriterien für Malignität	25
2.2.4 Diagnostische Klassifikation	26
2.2.5 Immunzytochemische Untersuchung	27
2.2.6 Einsatz der Immunzytochemie in der Erkennung einer Karzinose	33
2.2.7 Einsatz der Immunzytochemie in der Typisierung einer Karzinose	34
2.2.8 Einsatz der Immunzytochemie in der Planung einer adjuvanten Therapie bei einer Karzinose durch ein Mammakarzinom	39
2.2.9 Die Auswertung der Immunzytochemisch gefärbten Präparate	40
2.3 Grundlagen der statistischen Datenanalyse	41
2.3.1 Kennzahlen der statistischen Datenanalyse	41
2.3.2 Definition der Wertungskategorien	43

2.3.3	Definition der Evidenzlevel	44
3	Ergebnisse	47
3.1	Einführung zur Datenauswertung	47
3.2	Allgemeine Datenauswertung der Studie	47
3.3	Auswertung hinsichtlich Evidenzlevel	50
3.4	Ergussätiologie	51
3.4.1	Benigne Ergüsse	51
3.4.2	Maligne Ergüsse	53
3.4.3	Zusammenfassende Darstellung der häufigsten Ursachen beider Dignitäten ...	55
3.5	Immunzytochemische Untersuchungen zum Tumornachweis.....	56
3.5.1	Berechnung der Treffsicherheit nach Wertungskategorie 1.....	57
3.5.2	Berechnung der Treffsicherheit nach Wertungskategorie 2.....	60
3.5.3	Nachträglich durchgeführte Untersuchungen der Subkohorte 1	62
3.6	Immunzytochemische Untersuchung zur Tumortypisierung.....	66
3.6.1	Markerspezifische Betrachtung der Subkohorte 2	68
3.6.2	Nachträglich durchgeführte Untersuchungen der Subkohorte 2	70
3.7	Immunzytochemische Untersuchungen zur Hormonrezeptoranalyse und zur Her- 2/neu-Bestimmung	71
4	Diskussion.....	72
4.1	Stellenwert und Treffsicherheit der konventionellen Perikardzytologie.....	72
4.2	„ <i>Screening-Error</i> “ und „ <i>Sampling-Error</i> “ als Fehlerquellen der Perikardzytologie.....	74
4.3	Immunzytochemie als adjuvante Anwendung in der Zytologie.....	75
4.3.1	Immunzytochemie in der Tumordiagnostik.....	76
4.3.2	Beurteilung der falsch-klassifizierten Fälle in der Tumordiagnostik.....	80
4.3.3	Immunzytochemie in der Tumortypisierung	83
4.3.4	Beurteilung der falsch-typisierten Fälle in der Tumortypisierung	87
4.4	Ergussätiologie	89
4.5	Fazit	91
5	Literaturverzeichnis.....	94
6	Abbildungsverzeichnis.....	107
7	Tabellenverzeichnis.....	109

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Perikardhöhle, das Peritoneum und die Pleura sind voneinander getrennte Spalträume, deren gemeinsames Charakteristikum die Auskleidung durch die Tunica Serosa ist (Aumüller, 2010). Bei vielen benignen sowie malignen Grunderkrankungen kann es zu Flüssigkeitsansammlungen in einer oder mehreren dieser Körperhöhlen kommen, dabei handelt es sich stets um pathologische Akkumulationen. Pleuraergüsse treten, gefolgt von Aszites und Perikardergüssen, am häufigsten auf.

Innerhalb der Gruppe der Perikardergüsse finden sich als Ursache überdurchschnittlich häufig maligne Tumoren, da (im Unterschied zu Aszites- und Pleuraergüssen) Perikardergüsse im Rahmen hämodynamischer Erkrankungen oder Entzündungen vergleichsweise seltener vorkommen. Insofern ist jeder Perikarderguss so lange malignitätsverdächtig bis das Gegenteil bewiesen ist.

Primäre vom Perikard ausgehende Neoplasien sind zum Großteil benignen Natur und treten zudem sehr sporadisch auf (Burazor et al., 2013; Pinto, 1986; Reynen et al., 2004). Zu ihnen zählen Lipome, Hämangiome, Mesotheliome, Myxome sowie Teratome (Burazor et al., 2013; Hossfeld, 1988; Reynen, 1995a; Smith, 1986). Des Öfteren treten sekundäre Neoplasien auf. Neben den malignen Melanomen, die zahlreich Herzmetastasen bilden, finden sich vielfach Bronchial- (34-76%) und Mammakarzinome (10-17%) als Ausgangsbasis (Dequanter et al., 2008; Fiala & Schneider, 1982; Gornik et al., 2005; Jeong et al., 2012; Kim et al., 2010; Maisch et al., 2010; Reynen, 1995b). Bei metastatischen Vorgängen am Herzen ist am häufigsten das Perikard betroffen (Press & Livingston, 1987), gefolgt vom Myokard. Primärtumoren des Herzens, die rein formal auf das Perikard übergreifen können, sind so selten, dass sie klinisch im Grunde keine Rolle spielen.

Nach Angaben des statistischen Bundesamts waren im Jahre 2011 Erkrankungen des Kreislaufsystems mit 40,2% die häufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland. Danach folgen mit 26% der Sterbefälle maligne Entartungen, Männer sind hierbei etwas zahlreicher betroffen als Frauen (Statistisches-Bundesamt, 2012).

Diese statistische Auswertung der Todesursachen in Deutschland zeigt, wie wichtig die frühzeitige Diagnostik und Abklärung der Dignität von Perikardergüssen ist. Als eine der wertvollsten diagnostischen Methoden ist hierbei die Ergusszytologie samt adjuvanten Methoden zu nennen. Durch sie kann die Dignität eines Ergusses bestimmt werden; ferner kann im Tumorfall versucht werden, durch anschließende Immunzytochemie bei sekundären Neoplasien den *Primarius* zu ermitteln bzw. zumindest Aussagen zum Tumortypus zu treffen. Laut Bedrossian (1994) liefert in 45% aller malignen Ergüsse die Zytodiagnostik den ersten Hinweis auf den Primärtumor. Für eine kurative Tumorthherapie ist die Tumortypisierung von entscheidender Bedeutung. Denn adjuvante Therapieansätze in Form von Chemo- oder Radiochemotherapien, gegeben falls mit weiteren onkologischen Therapiekomponenten kombiniert, unterscheiden sich *expressis verbis* von *Primarius* zu *Primarius*. Patienten mit neoplastischen Perikardergüssen weisen zudem eine weitaus schlechtere Prognose auf, weil sich die Ergussbildung meist als Spätmanifestation einer malignen Grunderkrankung darstellt (Jeong et al., 2012; Refaat & Katz, 2011). Die Fälle metastasierter Malignome, deren Herkunft trotz aller diagnostischen Bemühungen disputabel bleibt, werden dem „CUP-Syndrom“ („*Cancer of unknown primary*“) zugeordnet. Laut Statistischem Bundesamt lag im Jahr 2003 das CUP-Syndrom auf Platz acht der häufigsten tumorbedingten Todesfälle in Deutschland (Seeber, 2007). Bei benignen Ergüssen kann eine Ergussanalyse sowohl auf die Grunderkrankung Hinweise geben als auch Anhaltspunkte für die Therapie liefern.

Auf Grund der klinischen Bedeutung spielen die Treffsicherheit der Zytologie sowie der Einsatz adjuvanter Methoden eine große Rolle (Jambhekar et al., 2008). Der diagnostische Wert der Immunzytochemie im Sinne einer adjuvanten Methode ist für die Identifizierung von neoplastischen Zellen in Ergüssen seröser Höhlen in der Literatur bereits hervorgehoben worden (C. W. Bedrossian, 1998; Dalquen, 1986; Lee et al., 1996; M. R. Mason et al., 1987; Silverman et al., 1987). Der Einsatz der Immunzytochemie bei Perikardergüssen nimmt (wie bereits dargestellt) innerhalb der Ergüsse seröser Höhlen eine separate Stellung ein, was in der medizinischen Literatur jedoch bislang spärlich untersucht worden ist.

1.2 Perikardergüsse

1.2.1 Anatomie und Physiologie

Das Herz hat als wichtigstes Organ des menschlichen Körpers die Aufgabe, Blut über den Herz-Lungen-Kreislauf zu den Lungenflügeln und über den Körper-Kreislauf in die Peripherie zu den einzelnen Organen zu befördern. Auf diese Weise versorgt es den gesamten Organismus mit lebensnotwendigen Sauer- und Nährstoffen (Moll K. J., 2006).

Lokalisiert ist das Herz im Thorax zwischen den beiden Lungenflügeln. Dabei liegt circa zwei Drittel seines Volumens in der linken und ein Drittel in der rechten Körperhälfte. Umgeben ist das Herz dabei vom Perikard, von diesem werden es und die Ursprünge der großen Gefäße umschlossen. Das Perikard besteht aus einer fibrösen Schicht, dem *Pericardium fibrosum* und einer serösen Schicht, dem *Pericardium serosum*. Letzteres besteht wiederum (wie alle serösen Häute) aus einem parietalen und einem viszeralen Blatt, zwischen diesen beiden Blättern formiert sich der Perikardspalt (Moll K. J., 2006). Das viszerale Blatt besteht aus einer einzelnen Lage mesothelialer Zellen und liegt dem Herzen bzw. dem epikardialen Fettgewebe unmittelbar auf (Erdmann, 2007). Diese Zellschicht sorgt für die Produktion der perikardialen Flüssigkeit, die physiologischer Weise ein Volumen von 15 bis 50 ml misst und ein Ultrafiltrat mit einem Proteingehalt von 1,7-3,5 g/dl und einem kolloid-osmotischem Druck von ungefähr 25% des Serums darstellt (Berglund et al., 1955; Erdmann, 2007; Hossfeld, 1988; McKenna et al., 1985). Auf diese Weise wird ein direkter Kontakt des permanent schlagenden Herzens mit benachbarten Strukturen inhibiert, hieraus resultiert eine Reduzierung des Reibungswiderstands und Minimierung der Reibungsverluste. Zusätzlich wird das Herz durch die Verbindung des Perikards mit dem Diaphragma und der Pleura fixiert, dadurch befindet sich das Herz in einer stetigen Position im Thorax (Erdmann, 2007). Auf diese Weise werden Funktionseinschränkungen durch etwaige Lageänderung des Körpers verhindert. Eine Überdehnung des Herzens bei starker körperlicher Beanspruchung wird durch die kaum dehnbare bindegewebige Struktur des Perikards verhindert (Erdmann, 2011; Holt, 1970; Shabetai et al., 1979). Darüber hinaus übernimmt das Perikard die Funktion einer immunologischen Schranke, denn es

verhindert ein direktes Übertreten von Entzündungen und Tumoren auf das Myokard (Erdmann, 2011).

1.2.2 Ätiologie und Pathogenese der Ergussbildung

Perikardergüsse sind, wie eingangs bereits erwähnt, pathologische Akkumulationen, bei denen das physiologische Flüssigkeitsvolumen von 15 bis 50 ml (Hombach, 2009) überschritten wird. Eine Vielzahl verschiedener Umstände und mehr als fünfzig verschiedene Erkrankungen (Böcking et al., 2000; Burazor et al., 2013) können ursächlich für die Entstehung von Perikardergüssen sein, dabei sind entzündliche (z.B. Tuberkulose) und tumoröse sowie systemische (z.B. Niereninsuffizienz) und hydrostatische (z.B. Linksherzinsuffizienz) Vorgänge zu unterscheiden (Tabelle 1). Einfluss auf die hydrostatische Komponente hat die Versorgung des Perikards, diese ist eine auf toxische Abbauprodukte sowie Störungen des hydrostatischen und onkotischen Drucks empfindlich reagierende Endstrombahn (Thümmeler et al., 1999). Außerdem treten idiopathische Ergüsse auf, die eine Ausschlussdiagnose darstellen. Gemeint sind Ergüsse, die ohne erkennbare Grunderkrankung auftreten, also nicht auf einen bekannten Pathomechanismus zurückgeführt werden können.

Tabelle 1: Ätiologie der Ergüsse seröser Körperhöhlen, modifiziert nach (Abdallah & Atar, 2014; Böcking et al., 2000).

Systemisch	Tumoren	Entzündungen	Stauungen	Traumatisch
Niereninsuffizienz Radiatio Zytostatika Urämie	Sarkomatosen Karzinosen Leukämie Maligne Mesotheliome Maligne Lymphome	Tuberkulose Syphilis Perikarditis: bakteriell, viral, fungal, parasitär Myokarditis Herzinfarkt	Herzinsuffizienz links	Thoraxtrauma

Die Perikardergüsse lassen sich hinsichtlich ihrer Genese in zwei Gruppen einteilen: Zum einen in „tumorzell-negative“ und zum anderen in „tumorzell-positive“ Ergüsse. In der Gruppe der malignen Perikardergüsse sind Primärtumoren jedoch sehr selten, viel zahlreicher sind sekundäre Neoplasien des Perikards (Maisch et al., 2004; McKenna et al., 1985; Prichard, 1951; Reynen, 1996). Metastasierungen des Herzens

werden in etwa 3-4% aller Autopsien und bei 15-21% der Autopsien von Patienten mit malignen Grunderkrankungen nachgewiesen (Bisel et al., 1953; DeCamp et al., 1997; Lockwood & Broghamer, 1980), wobei laut einer Studie von Press und Livingston (1987) zu 70% das Perikard mitbetroffen ist. Die Metastasen können sowohl hämatogen oder lymphatisch aber auch direkt durch eine enge Lagebeziehung entstehen. Das Auftreten von perikardialen Metastasen scheint sich durch die stetig verbesserten Therapieansätze und steigende Überlebenszeit zu potenzieren (Fiala & Schneider, 1982; Maisch et al., 2010). Dabei ist die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung von dem jeweiligen *Primarius* bestimmt, bei malignen Melanomen und bei Leukämie liegt die Inzidenz einer Herzmetastasierung bei 56,6% bzw. 47,5% (Fiala & Schneider, 1982). Die häufigsten Metastasen gehen jedoch aufgrund der Topographie und Lagebeziehung von Brust und Lunge aus (Dequanter et al., 2008; Hancock, 1990; Jeong et al., 2012; Lam et al., 1993). Das ergaben bereits Studien in den 50er-Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts (Goudie, 1955; Young & Goldman, 1954). Es soll erreicht werden, die Karzinose im Frühstadium zu entdecken. Überleben des Patienten und die Prognose hängen maßgeblich vom Zeitpunkt der Erstdiagnose ab. Überdies ist die Aussicht auf Heilerfolg umso größer je früher eine qualifizierte spezifische Therapie durchgeführt wird (Seeber, 2007). Als Resultat des perikardialen Tumorbefalls kommt es durch Irritationen der Tunica Serosa zu einer gesteigerten Produktion von Flüssigkeit. Konsekutiv akkumuliert diese Flüssigkeit durch Obliterationen der Venen und Lymphgefäße, sodass es bei der lymphatischen Drainage des Perikards zu einem Ungleichgewicht zwischen der kapillären Filtration und des osmotischen Drucks kommt (Hossfeld, 1988; Miller, 1970; Miller, Jain, et al., 1971; Miller, Pick, et al., 1971).

Innerhalb der „tumorzell-negativen“ Ergüsse ist neben den entzündlichen, systemischen und hydrostatischen, auch die beträchtliche Gruppe der idiopathischen Ergüsse zu finden (Abdallah & Atar, 2014; Fernandes et al., 1998; Rashed et al., 2007). Dieses oft sehr große Kollektiv stellt in vielen Fällen eine unbefriedigende Ausschlussdiagnose am Ende der diagnostischen Kette dar. Des Weiteren wird in einigen US-amerikanischen Studien das HI-Virus als Ursache für Ergüsse diskutiert (Gouny et al., 1998). In einigen dieser Studien wurde das AIDS (*Acquired Immune*

Deficiency Syndrome) in bis zu 35% der Ergüsse als ursächlich angesehen (Kwan et al., 1993). In europäischen Studien konnte diese Theorie bislang nicht belegt werden.

Bei langsamer Entstehung bleibt der Perikarderguss in vielen Fällen asymptomatisch (Halfdanarson et al., 2006), dabei kann sich eine Flüssigkeitsmenge von bis zu 2000 ml ansammeln. Bei schnellen intraperikardialen Druckerhöhungen kann bereits ein Flüssigkeitsvolumen von 80 bis 200 ml zu Beschwerden und ausgeprägten hämorrhologischen Effekten führen (Saito et al., 2008). Wird der intraperikardiale Druck höher als die diastolische Füllung der beiden Ventrikel, kommt es zu einer Kompression sowohl des rechten Vorhofs als auch Ventrikels und damit zu einer Verminderung des Schlagvolumens des Herzens (Erdmann, 2011; Holt et al., 1960; Hossfeld, 1988). Sodann liegt eine Perikardtamponade vor. Die Abnahme des Schlagvolumens resultiert laut Erdmann (2011) auf Grund einer adrenergen Gegenregulation in einem konsekutiven Anstieg der Herzfrequenz und eine Erhöhung der Ejektionsfraktion. Der peripherarterielle Widerstand nimmt zu, dadurch kann der systemische Blutdruck bei verminderter Auswurfleistung des Herzens vorübergehend stabil bleiben. Bei einer persistierenden Tamponade kommt es zu einem Zusammenbruch dieser Kompensationsmechanismen. Die hierdurch begünstigte Minderperfusion der Organe kann zu einer reversiblen oder irreversiblen ischämischen Schädigung führen (Erdmann, 2011).

Bei Flüssigkeitsansammlungen in serösen Körperhöhlen wird zumeist eine klinische Unterteilung in Transsudat und Exsudat vorgenommen (Light, 1997), in einigen Fällen werden zusätzlich neoplastisch bedingte Ergüsse unterschieden (Van Haam, 1977). Der Beurteilung von Freudenberg et al., der zur Folge mehr als 40% aller Ergüsse malignombedingt sind und 70% der Exsudate durch maligne Tumoren verursacht werden, ist seine Empfehlung geschuldet bei Ergüssen zweifelhafter Ursache eine zytologische Untersuchung der Ergussflüssigkeiten - insbesondere der Exsudatflüssigkeiten - durchzuführen (Freudenberg et al., 2002).

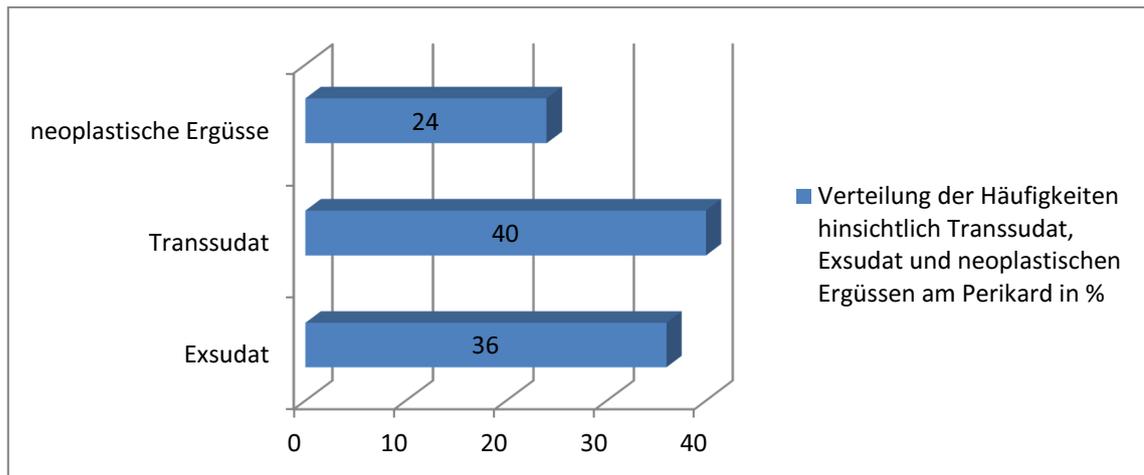


Abb. 1: Verteilung der Häufigkeiten bezogen auf das Perikard hinsichtlich Transsudate, Exsudate sowie neoplastischen Ergüssen (Van Haam, 1977).

Transsudate: Diese zell- und eiweißarmen Flüssigkeitsansammlungen entstehen bei Stauungen, wie sie z.B. im Zuge einer Herzinsuffizienz, portalen Hypertension oder Niereninsuffizienz vorkommen können. Folglich kommt es zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen dem onkotischen und hydrostatischen Druck. In der Gruppe der Perikardergüsse nehmen sie laut van Haam (1977) einen Anteil von 40% ein (s. Abb. 1).

Exsudate: Diese zell- und eiweißreichen Flüssigkeitsansammlungen entstehen, wenn es auf Grund von Entzündungen zu einer gesteigerten kapillaren Permeabilität für Zellen und Proteine kommt. Bei Perikardergüssen nehmen sie einen Anteil von 36% ein (s. Abb. 1). Beispiele für entzündliche Prozesse, die auch bei dem dieser Arbeit zugrundeliegendem Patientenkollektiv vorliegen, sind z.B. Perikarditis oder Tuberkulose. Allerdings kann es auch durch tumoröse Veränderungen zu Lymphabflussbehinderungen und somit zur Bildung eines Exsudates kommen. Laut Freudenberg sind 70% der Exsudate durch bösartige Tumoren verursacht, daher verlangt ein Exsudat immer eine weitere diagnostische Abklärung (Freudenberg et al., 2002).

1.2.3 Klinik und Diagnostik

Die Diagnose eines Perikardergusses erfolgt aus der Kombination von körperlicher Untersuchung, Echokardiographie, Elektrokardiographie, Computertomographie,

Magnetresonanztomographie sowie Thoraxröntgenaufnahmen. Die Dignität des Ergusses kann jedoch abschließend nur durch ein Punktat oder Perikardbiopsat geklärt werden. Die Perikardpunktion ist in diesem Fall als minimalinvasive, diagnostische - aber auch als therapeutische Intervention - zu werten, da auf diese Weise eine Dekompression des Herzens erfolgt.

Anamnese & klinische Untersuchung

Die Anamnese zielt auf die Erfragung bestehender Vorerkrankungen, Medikamentierung (Immunsuppressiva) und erfolgter Vorbehandlungen (z.B. Chemotherapie, Radiatio) hin, denn diese können einen Hinweis auf die Herkunft des aktuellen Beschwerdebildes geben. Im weiteren Verlauf gibt eine gründliche körperliche Untersuchung weiteren Aufschluss über das Krankheitsbild. Während schnell auftretende und großvolumige Ergüsse zu 81% mit Dyspnoe, 48% mit Husten und 26% mit Thoraxschmerzen einhergehen (vgl. Tabelle 2), können kleinvolumige oder langsam entstehende Perikardergüsse asymptomatische bleiben (Refaat & Katz, 2011). Nach einer Zusammenstellung der Daten aus der Literatur weisen 78% der Patienten mit kardialen und 68% der Patienten mit perikardialen Metastasierungen keine der genannten Symptome auf (Hossfeld, 1988).

Tabelle 2: Relative Häufigkeit verschiedener Symptome bei Patienten mit malignem Perikarderguss (Hossfeld, 1988).

Symptome	Häufigkeit	Prozent (%)
Dyspnoe	273/335	81
Husten	95/199	48
Orthopnoe	49/187	26
Thoraxschmerz	64/248	26
Allgemeine Schwäche	33/158	21
Dysphagie	10/55	18
Schwindel	2/16	13
Palpitationen	9/175	5
Synkope	4/93	4

Im Falle einer bestehenden Perikardtampnade zeigt sich eine typische Halsvenenstauung, Tachykardie, Tachypnoe und Pulsus paradoxus. Bei hypovolämischen Patienten mit einer Perikardtampnade kann allerdings das weisende Anzeichen einer

Venenstauung fehlen (Erdmann, 2011; Wilkes et al., 1995). Nach Guberman et al. zeigen sich folgende Symptome bei einer Herztamponade (Guberman et al., 1981):

Tabelle 3: Klinische Symptome einer Herztamponade (Guberman et al., 1981).

Symptome	Häufigkeit in %
Erhöhter jugularvenöser Druck	100%
Pulsus paradoxus	98%
Atemfrequenz >20/min	80%
Herzfrequenz > 100/min	77%
Systol. Blutdruck < 100 mmHG	64%
Abgeschwächte Herztöne	34%
Perikardreiben	29%
Elektr. Alternans (P, QRS, T)	20%

Elektrokardiographie

Die Elektrokardiographie ist das schwächste Element der Diagnostik. Hinweisend auf eine Tamponade ist neben einer Tachykardie ein zu beobachtender elektrischer Alternans der R-Zacke, der maßgeblich durch eine Pendelbewegung des Herzens mit halber Herzfrequenz entsteht (Erdmann, 2011; Mewis, 2004; Ristic et al., 2005).

Laborparameter

Die gängigen Laborparameter, wie großes Blutbild, Gerinnungswerte, Elektrolyte und Nierenparameter werden bei jedem Patienten routinemäßig erhoben. Auf Grundlage der Punktionsflüssigkeit sollte der Hämoglobin-, Cholesterin-, Glukose- und Proteingehalt bestimmt werden sowie eine mikrobiologische Testung erfolgen (Burchardi et al., 2008; Karatolios & Maisch, 2007; Mewis, 2004).

Bildgebende Diagnostik

Im Röntgenthorax ist eine Vergrößerung des Herzschattens erst ab einem Erguss von 250 ml und mehr ersichtlich (Erdmann, 2011). Zeigt sich jedoch ein klares Lungenfeld, so ist dies ein wichtiger differentialdiagnostischer Hinweis einer Linksherzinsuffizienz (Battegay, 2013). Für eine dreidimensionale Diagnostik stehen die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie zur Verfügung. Durch diese Diagnostik ist auch eine Beurteilung der Nachbarstrukturen gewährleistet, zusätzlich

ist bei der Computertomographie der Einsatz von Kontrastmitteln bei Bedarf möglich (Harries et al., 1998; Rajiah, 2011; Reynen et al., 2004).

Das diagnostische Mittel der ersten Wahl ist auch heute noch die Echokardiographie. Sie eignet sich aufgrund der überschaubaren, schnellen und vor allem nichtinvasiven Methode zur Erkennung und Verlaufskontrolle (Berg et al., 1997; Erdmann, 2011; Kutalek et al., 1985). Wie schon Ende der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts erfolgen Diagnose, Lokalisation und Bestimmung der Größe des Ergusses standardisiert echokardiografisch (Friedman et al., 1979; Imazio et al., 2010).

Zytologische Diagnostik

Ein weiteres potentes Diagnostikum stellt die zytologische Untersuchung dar (Talreja et al., 2008). Im Rahmen der echokardiographiegesteuerten Perikardpunktion werden die Zellen durch Erzeugung von Unterdruck in die Nadel aspiriert, wobei eine Provokation von Fernmetastasen durch verschleppte maligne Zellen nicht zu befürchten ist (Dietrich, 2011; Tsang et al., 2002). Dieser minimal-invasive Eingriff ist ambulant durchführbar (Motherby, Kube, et al., 1999). Für zytologische Untersuchungen ist ein Volumen von mindestens 50-100 ml vom tiefsten Punkt der Perikardhöhle erforderlich. Auf diese Weise kann die diagnostische Treffsicherheit optimiert werden, da sie stark von der Menge des Untersuchungsmaterials und der Zellkonzentration abhängt (Böcking et al., 2000; Leff et al., 1978).

An adjuvanten Methoden in der zytologischen Diagnostik, mit welchen man die Treffsicherheit verbessern möchte, stehen die Immunzytochemie, die Gegenstand dieser Arbeit ist, zur Verfügung, ferner die DNA-Bildzytometrie (Rodriguez de Castro et al., 1994), Spezialfärbungen wie die AgNOR-Analyse (Carrillo et al., 1994), die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und alle PCR-basierten molekularen Untersuchungsmethoden. Während die Sensitivität der konventionellen zytologischen Diagnostik für die Detektion von malignen Zellen in Ergüssen seröser Höhlen im Mittel 60% beträgt, wie sich in einer Literaturübersicht von sechs Studien mit über 6000 Patienten herausstellte (Spriggs, 1989), lässt sie sich bei weitergehend gleichbleibender Spezifität die Sensitivität durch adjuvante Methoden teils deutlich erhöhen (vgl. Kapitel 1.3).

1.2.4 Therapie

Primär richtet sich die Behandlung eines Perikardergusses nach dem Ausmaß der hämodynamischen Obstruktion und erst sekundär nach der ätiologischen Krankheit (Erdmann, 2011). Bei hämodynamisch relevanten Perikardergüssen ist die Punktion im Sinne einer therapeutischen Intervention angezeigt. Bei Verdacht auf eine maligne oder infektiöse Ursächlichkeit sollte die Punktion zu diagnostischen Zwecken (laborchemische, zytologischen, mikrobiologische Diagnostik) und zur Therapieausrichtung erfolgen (Erdmann, 2011; Imazio et al., 2010). Die Perikardiozentese erfolgt dann unter echokardiographischer Kontrolle (Gyr, 2003), um Komplikationen, wie z.B. Verletzung des Myokards oder eines Pneumothorax zu vermeiden (Burchardi et al., 2008; Vaitkus et al., 1994). Komplikationen bei Punktion sind heutzutage gering. Laut Studien liegt die Erfolgsrate bei bis zu 99%, während die häufigsten Risiken, wie Punktion des rechten Ventrikels (3-10%), Pneumothorax (1-2%), Schock (<1%) und ventrikuläre Arrhythmien als gering einzustufen sind (Krikorian & Hancock, 1978; Permanyer-Miralda et al., 1985; Tsang et al., 1998; Vayre et al., 1998; Wong et al., 1979). Dabei ist neben der Aspiration der Flüssigkeit auch die Möglichkeit gegeben den intraperikardialen Druck zu messen. Wie im vorherigen Kapitel bereits erwähnt, ist auf den richtigen Entnahmeort sowie die korrekte Entnahmemenge akkurat zu achten. In einer Studie aus den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts wird die Perikardpunktion bereits als beste Behandlungsform genannt, weil durch die folgende zytopathologische Untersuchung des gewonnenen Materials die Diagnose, Therapie und Prognose entscheidend positiv beeinflusst werden kann (Kotte & McGuire, 1951). Auch neuere Studien schließen sich dieser Einschätzung an (Apodaca-Cruz et al., 2010; Berg et al., 1997). Die zusätzliche intraperikardiale Verabreichung von Tetracyclin bzw. Doxycyclin erwies sich ebenfalls als sehr wirksam (Davis et al., 1984; Salamon et al., 1989). Es ist des Weiteren unbedingt erforderlich, die jeweilige Grunderkrankung zu therapieren, um rezidivierende Ergüsse zu vermeiden. Die pleuroperikardiale oder peritoperikardiale Fensterung, sowie die verschiedenen Formen der Perikardiotomie, sind nur bei den therapierefraktären Rezidiven indiziert (Seeber, 2007).

Im Falle maligner Perikardergüsse ist es initial außerordentlich wichtig, hämodynamische Obstruktion des Ergusses möglichst minimal zu halten und eine Perikardtampnade abzuwehren. Gelingt dies, richtet sich die Prognose bei den erkrankten Patienten nach der ursächlichen Karzinose und der Effizienz einer sachgerechten, tumorspezifischen Behandlung (Seeber, 2007). Die Therapie umfasst abhängig vom Primärmalignom auch die Strahlen- und Chemotherapie.

Die Prognose eines benignen oder malignen Perikardergusses ist in der Literatur nicht eindeutig geklärt, allerdings wird überwiegend die Auffassung vertreten, dass eine Perikardbeteiligung sich meistens als Spätmanifestation einer Erkrankung und somit als prognostisch ungünstig darstellt (Goldman & Pearson, 1965; Kim et al., 2010; Ore et al., 2013). Dem gegenüber beschreibt Garcia-Riego aber auch, dass in 48% der Fälle der Perikarderguss als Erstmanifestation einer malignen Erkrankung auftrat (Garcia-Riego et al., 2001).

1.3 Zielsetzung

Die Untersuchung von Perikardflüssigkeiten gehört zu den Routineanwendungen der Zytopathologie, stellt aber üblicherweise im Vergleich zu den Fällen von Pleuraflüssigkeiten und Peritonealflüssigkeiten nur einen kleinen Anteil des Untersuchungsgutes dar. Da alle drei Arten von Flüssigkeiten gleichartig technisch aufbereitet werden und auch gleiche Morphologien aufweisen, werden sie in vielen Studien, die sich mit der diagnostischen Wertigkeit der Zytopathologie befassen, gemeinsam betrachtet. Dem gegenüber werden aber etwaige Spezifika jeder Flüssigkeitsart kärglich beschrieben.

Die Sensitivität der konventionellen zytologischen Diagnostik für die Detektion von malignen Zellen in Ergüssen beträgt laut einer Studie von Motherby (1999) - wie in Tabelle 4 dargestellt - nur etwa 53%, die Gesamttreffsicherheit beläuft sich auf 78,2% (Böcking et al., 2000). Schwerpunkt der Studie war allerdings die pleurale Ergussdiagnostik, aus der 213 von 312 Fällen (= 68,2%) stammten; perikardiale Flüssigkeiten waren mit nur 7 Fällen (= 2,2%) kaum vertreten.

Tabelle 4: Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik der Ergüsse seröser Körperhöhlen (Motherby, 1999), modifiziert nach (Böcking et al., 2000).

Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik der Ergüsse seröser Körperhöhlen (213 pleurale, 85 peritoneale, 7 perikardiale, 8 Lavagen)	
Statistische Kennzahlen	Treffsicherheit ohne adjuvante Methoden in (%)
Sensitivität	53,4
Spezifität	93,3
Gesamttreffsicherheit	78,2
Klassifikationsgenauigkeit	84,6
Anteil zytologische unklarer Fälle in %	8,7

Damit wurden an der Universitätsklinik Düsseldorf seinerzeit etwa die Werte erreicht, die auch in einer Literaturübersicht von sechs Studien mit über 6000 Patienten dokumentiert worden waren; dort belief sich die Sensitivität der konventionellen zytologischen Diagnostik für den Nachweis von malignen Zellen in Ergüssen seröser Höhlen im Mittel auf 60% (Spriggs, 1989). Speziell bei der Betrachtung der Perikardergüsse schwanken die Aussagen hinsichtlich eindeutiger Diagnosen der Ergusszytologie, beginnend 26% (Corey et al., 1993) über 84,6% (Posner et al., 1981) bis hin zu einer erzielten Sensitivität von 92% und Spezifität von 100% in einer Studie von Meyers et al. (1997).

Um die Sensitivität der Untersuchung anzuheben, sollte nicht nur konventionell zytologisch diagnostiziert werden, sondern auch unter Einbeziehung adjuvanter Methoden. Zu diesen zählen neben konventionellen Spezialfärbungen (PAS, Eisenfärbung etc.) die Immunzytochemie und die DNA-Zytometrie (Böcking, 1995), ferner auch die Elektronenmikroskopie, die Zytogenetik und die AgNOR-Histochemie (Pomjanski et al., 2001); der Zytopathologe verspricht sich hiervon eine signifikante Erhöhung der Treffsicherheit der Zytodiagnostik. Die Erhöhung der Treffsicherheit in der Ergusszytologie durch die genannten adjuvanter Methoden wurde ebenfalls in einigen Studien untersucht. So erforschte Shield et al. Marker zur Detektion von Adenokarzinomen in serösen Ergüssen, in seiner Studie konnten für einzelne Marker, wie z.B. BerEp4, eine Sensitivität von 34% erzielt werden. Die Sensitivität von untersuchten Markerkonstellationen belief sich auf bis zu 84% (Shield et al., 1994). Ebenso zeigte sich in einer Studie zur Treffsicherheit der Ergusszytologie samt adjuvanter Untersuchungsmethoden (beinhaltet Immunzytochemie und/oder DNA-

Zytometrie) von Motherby et al (1999), dass sowohl eine Steigerung der Sensitivität von 53,4% auf 61% als auch eine Steigerung der Spezifität von 93,3% auf 99% zu erzielen ist. Zudem gibt es eine Reihe von Arbeiten über die Anwendung spezifischer Antikörper für die immunzytochemische Identifizierung des jeweiligen Primärtumors. Folgende Primärtumoren wurden dabei untersucht: das papilläre Adenokarzinom des Ovars (Guzman, Hilgarth, et al., 1988), das Mammakarzinom (Guzman, Costabel, et al., 1988) sowie kleinzellige Karzinome der Lunge (Guzman et al., 1990). Die separate Betrachtung eines einzelnen Markers besitzt jedoch häufig keine hinreichende Aussagekraft, es bedarf daher der Reflexion des gesamten angewandten Markerpanels.

In der hier vorliegenden Studie steht als alleinige adjuvante Methode die Immunzytochemie von Perikardergüssen im Fokus. Sie ist die am Schwerpunkt für Cytopathologie an der Universitätsklinik Düsseldorf bei Ergüssen meist angewandte adjuvante Methode. Bei ihrer Verwendung wiederum kommen zwei grundsätzliche Konstellationen zutragen:

- Zum einen gibt es Fälle, bei denen man Tumorzellen für möglich hält, aber sie konventionell-zytologisch nicht beweisen kann; hier wird die Immunzytochemie zum Beweis von Tumorzellen oder zu ihrem Ausschluss eingesetzt.
- Zum anderen gibt es Fälle, bei denen Tumorzellen sicher sind, der Kliniker sich aber gerne Sicherheit darüber verschaffen möchte, welcher Primärtumor zu Grunde liegt. Bei klinisch bereits bestehendem Verdacht auf einen bestimmten Primärtumor oder bei zuvor bekanntem Primärtumor können hier spezifische Marker oder -kombinationen angewandt werden. Liegt ein „*Cancer of unknown primary*“ (CUP) vor, so ist ein breiterer Markereinsatz sinnvoll und möglich.

Am Schwerpunkt Cytopathologie der Universität Düsseldorf wurden zwischen 2002 und 2011 an 595 Perikardergüssen Untersuchungen durchgeführt. Im Rahmen dieser Dissertation soll aus dem zugrunde liegenden Kollektiv untersucht werden, in welchen Fällen man mit immunzytochemischen Sonderverfahren eine eindeutige Diagnose bzw. eine präzisierete Diagnose erreichen konnte bzw. nachträglich noch erzielen kann. Dazu wurde das *Follow-Up* der Patienten erhoben und retrospektiv auf die durchgeführte Diagnostik bezogen.

2 Material und Methode

2.1 Patientenkollektiv

2.1.1 Auswahl der Patientenpopulation

Die vorliegende Studie ist eine retrospektive Analyse von Perikardergüssen der Jahre 2002 bis 2011. Das Patientengut entstammte der Universitätsklinik Düsseldorf und kooperierenden Krankenhäusern. Die Einsichtnahme in die Patientenbefunde erfolgte am Schwerpunkt Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf (Leiter: Prof. Dr. A. Böcking [31.12.2009], Prof. Dr. S. Biesterfeld [überlappend seit 1.11.2009]), an dem auch primär die Probenpräparation und die zytopathologische Diagnostik vorgenommen wurden. Außerdem wurden die klinischen Akten der Patienten bei den zuweisenden Kliniken eingesehen.

Anhand der patientenbezogenen Daten wie Krankengeschichten, Konsilschreiben, den Arztbriefen und der histologischen Befunde konnten die zytologischen Diagnosen überprüft werden und eine klinische Aufarbeitung im Sinne eines *Follow-Ups* erfolgen, ein Ethikvotum (Aktenzeichen 4165) liegt vor.

Die Gesamtzahl der in diesem Zeitraum punktierten Patienten belief sich auf 456, dabei wurden die Proben von 84 Patienten immunzytochemisch weiter untersucht (=18,4%). Nur auf diese bezog sich die Anwendung der im Folgenden genannten Einschlusskriterien.

2.1.2 Einschlusskriterien

Von den 84 Patienten erfüllten sechs die Einschlusskriterien für das *Follow-Up* nicht, da die Datenerhebung in den überweisenden Krankenhäusern und Praxen erfolglos blieb; bei zwei weiteren Patienten waren für eine immunzytochemische Auswertung zu wenige Zellen vorhanden. Die Gesamtzahl der in der vorliegenden Studie eingeschlossenen Patienten beläuft sich somit auf 76 Patienten, von denen 79 Proben untersucht wurden. Diese wurden nach drei Modi untersucht:

a) In 29 Proben, bei denen anamnestisch kein Tumorleiden bekannt war und/oder die konventionelle Zytologie ein „zweifelhaftes“ Ergebnis erbrachte, erfolgte eine immunzytochemische Diagnostik zum Tumornachweis oder -ausschluss. Dies geschah üblicherweise durch Anwendung der immunzytochemischen Marker BerEP4 und HEA 125, die typischerweise epitheliale Antigene markieren, welche bei mesothelialen Zellen nicht vorhanden sein sollten.

b) Ebenfalls untersucht wurden 47 Proben, bei denen anamnestisch ein Primärtumor bekannt war oder durch die konventionelle Zytologie bereits gesichert worden war. Bei diesen Patienten wurde eine immunzytochemische Typisierung vorgenommen. Hierzu wurden vorzugsweise Marker wie CK7, CK5/6, CK20 sowie TTF1 eingesetzt, gelegentlich in Abhängigkeit von der Tumoranamnese auch andere (s. Kapitel 2.2.6).

c) Bei weiteren drei Proben erfolgten HER-2/neu-Bestimmungen und Hormonrezeptoranalysen. Bei zwei Patientinnen lag ein bekanntes Mammakarzinom vor, bei einer Patientin der Kohorte wurde mit zusätzlichen Markern, wie CK 5,6,7,20, CA125, CDX2, TTF1 und Mammaglobin zugleich der *Primarius* bestimmt. Bei dieser Art der immunzytochemischen Untersuchung geht es nicht um die Bestimmung der Dignität eines Perikardergusses oder um die Feststellung des *Primarius*, vielmehr lässt sich bei bestehendem Mammakarzinom durch die immunzytochemischen Ergebnisse eine prognostische Aussage treffen. Zudem kann der Kliniker therapeutische Konsequenzen aufgrund des Ergebnisses ziehen. Haben mehr als 10% der Tumorzellkerne für den Östrogen- und/oder für den Progesteronrezeptor „positiv“ reagiert, ist von einem „hormonrezeptorpositiven“ Ergebnis auszugehen. Wenn die Kernfärbbarkeit bei beiden gänzlich fehlt, ist von einem „hormonrezeptornegativen“ Ergebnis auszugehen (Seeber, 2007). Für die Therapie bedeutet dies, dass „hormonrezeptorpositive“ Karzinome auf eine endokrine Therapie ansprechen, „hormonrezeptornegative“ Karzinome jedoch nicht (Seeber, 2007). HER-2/neu (*human-epidermal-growth-factor-receptor-2*) gehört zu der Gruppe der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren, dabei hat HER-2/neu Einfluss auf eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie zum Beispiel die Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie auf die Apoptose (Olayioye, 2001).

2.1.3 Geschlechterverteilung

Bei den 76 Patienten handelt es sich um 39 weiblichen und 37 männlichen Geschlechts. Dies entspricht einer Geschlechtsverteilung im Patientengut von 51% Frauen zu 49% Männern. Die prozentuale Verteilung stellt sich grafisch wie in Abbildung 2 ersichtlich dar:

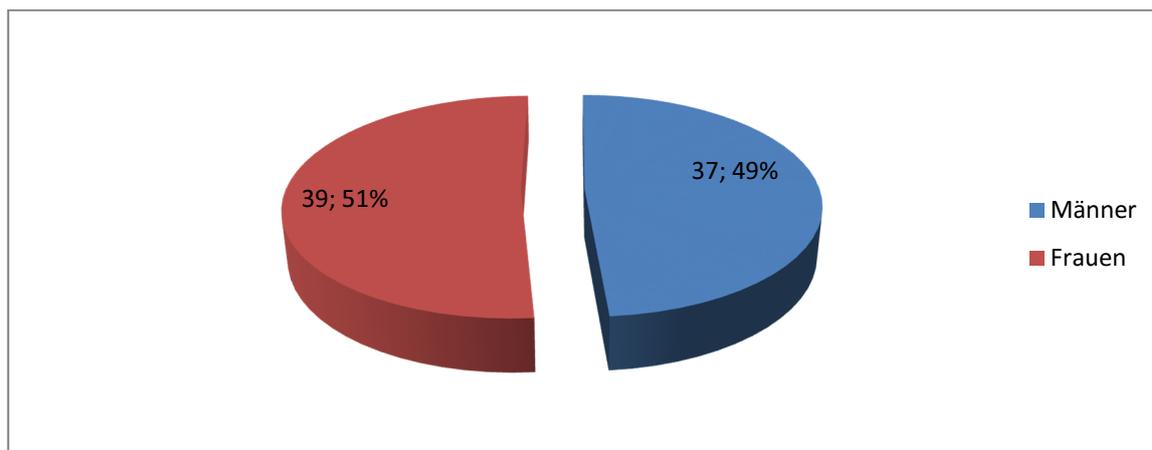


Abb. 2: Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs (n=76). Absoluter Zahlenwert; Prozentwert

2.1.4 Altersverteilung

Die 76 Patienten waren zwischen 23 und 90 Jahre alt; der geschlechterübergreifende Mittelwert liegt bei 61,6 +/- 13,0 (Standardabweichung) Jahren. Die Altersverteilung zeigt bei den Patientinnen einen Mittelwert von 60,7 Jahren (Streuung von 32 bis 90 Jahre) und bei den Patienten einen Mittelwert von 62,6 Jahren (Streuung von 23 bis 90 Jahre) auf. Die Verteilung (Abb. 3) zeigt einen deutlichen geschlechterübergreifenden Anstieg der Prävalenz beginnend mit dem 41. Lebensjahr. Bei Frauen bildet sich ein Plateau zwischen dem 51. und 80. Lebensjahr, während bei den Männern ein Maximum an erkrankten Patienten zwischen dem 61. bis 70. Lebensjahr erreicht ist.

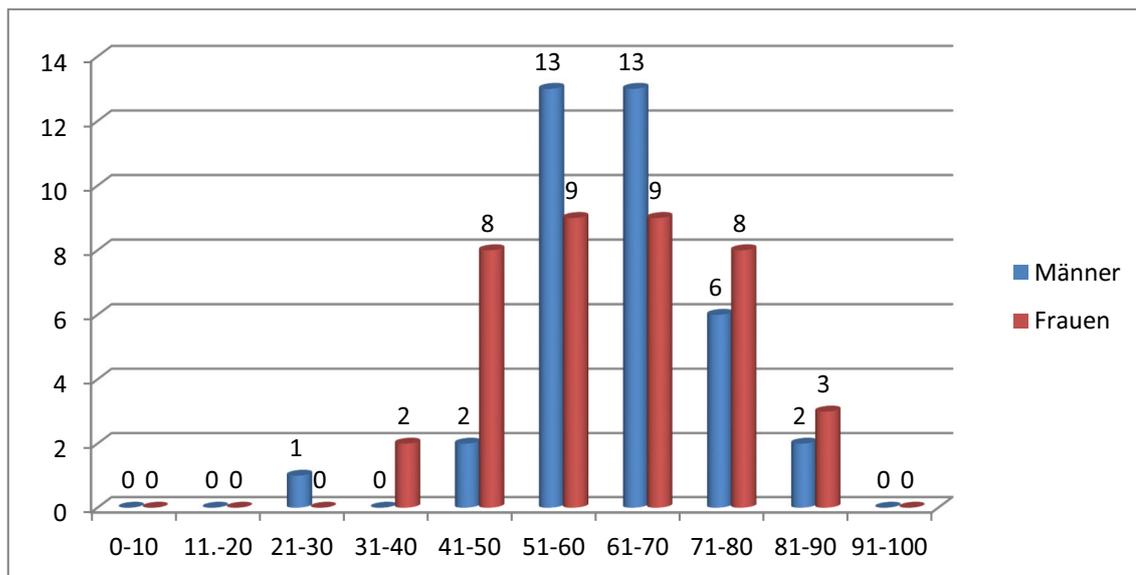


Abb. 3: Einteilung der Patienten nach Altersklassen und Geschlecht.

2.2 Materialaufbereitung

2.2.1 Klinische Vorgehensweise der Materialgewinnung

Die Perikardiozentese ist als minimalinvasiver Eingriff ambulant ausführbar und erfolgt echokardiographiegesteuert. Das Punktat sollte aus zytopathologischer Sicht an der tiefsten Stelle der Perikardhöhle entnommen werden, weil die diagnostisch bedeutsamen Zellen dorthin absinken (Böcking et al., 2000). Auf Grund der Tatsache, dass die zytologische Treffsicherheit von der Masse des untersuchten Materials abhängt, ist es angezeigt, möglichst ausreichende Volumina (50-100 ml) oder multiple Punktate einzusenden (Böcking et al., 2000; Motherby, Nadjari, et al., 1999). Die Punktatmenge variiert in der vorliegenden Studie zwischen 4-1600 ml. Die gewonnene Ergussflüssigkeit wird in sterilen und dicht schließenden Gefäßen ins Labor transportiert. Die diagnostisch wertvollen Zellen überdauern in der nativen und sehr proteinreichen Ergussflüssigkeit eine zweitägige Beförderung, ohne dabei eine morphologische oder immunologische Beeinträchtigungen zu erfahren (Böcking et al., 2000). Ist die sofortige Einsendung nicht möglich, so kann das Ergussmaterial vor Ort zentrifugiert werden. Dabei ist seine ursprüngliche Farbe, Konsistenz und Gestalt zu notiert, da sie der späteren Diagnostik dient. Außerdem sind Informationen über die allgemeine Anamnese, klinische Befunde und Verdachtsdiagnosen durch den Kliniker

auf dem Einsendeschein zu vermerken, da dessen Erkenntnisse für die Analyse der Zytologiebefunde und Auswahl der immunzytochemischen Marker einen entscheidenden Hinweis liefern können. Ebenso sollten durchgeführte therapeutische Maßnahmen wie Radiatio oder Chemotherapie erwähnt werden, da diese ursächlich für den Erguss sein können (Refaat & Katz, 2011) oder die zytologische Erscheinung stark verändert haben können, sodass zum Beispiel bei vorheriger Chemotherapie oder Radiatio ein an sich „tumorzell-negatives“ Zellmaterial durch die Zellveränderung als „zweifelhaft“ oder „dringend verdächtig“ eingestuft wird.

2.2.2 Herstellung der Ausstrichpräparate für die Ergusszytologie

Das durch die Perikardiozentese erhaltene native Zellmaterial wird in 30 oder 50 ml Einheiten abgefüllt und auf 3-5°C temperiert eingelagert. Bei diesen optimalen Voraussetzungen ist es bis zu drei Tage beständig. Wenn jedoch möglich, ist gewiss die Verarbeitung am entsprechenden Tag zu bevorzugen (Böcking et al., 2000). Eine Zugabe von Antikoagulanzen und Konservierungsmitteln ist nicht notwendig (Klöppel et al., 2011). Die eingesandte Menge, die Farbe, der Geruch und die Konsistenz des Materials sind zu dokumentieren und zu unterscheiden zwischen serösem, hämorrhagischem und eitrigem Erscheinungsbild (Freudenberg et al., 2002). Diese Informationen sind von Bedeutung und gehen in die spätere Diagnosefindung ein. Die weitere standardisierte Vorgehensweise am Schwerpunkt Cytopathologie der Universität Düsseldorf ist im Folgenden beschrieben:

Zentrifugation

In der Fachliteratur werden verschiedene Aufbereitungsmethoden zur Konzentration von Zellen beschrieben. Die am Schwerpunkt Cytopathologie angewandte Methode ist die der Zentrifugation (500g/5min).

Beschriftung

Es folgt die Beschriftung mit der Eingangsnummer des Instituts (C-Nummern) und das Durchnummerieren von insgesamt 6 Objektträgern.

Beschicken der Objektträger

Je ein Tropfen zuvor aufgeschütteltes Sediment wird mit einer Pasteurpipette auf den jeweiligen Objektträger aufgebracht, bevor ein zweiter Träger flach aufgelegt und anschließend abgezogen wird. Durch die Kapillarkräfte findet so eine Verteilung des Sediments auf beiden Objektträgern auf einer Fläche à 24 * 60 mm Fläche (= 43 cm²) statt. Bei diesem Vorgehen ist darauf zu achten, dass die Präparate gleichmäßig - in keinem Fall zu dick oder unregelmäßig - ausgestrichen werden. Auf diese Weise werden sechs Objektträger beschickt.

Die Objektträger eins bis drei werden luftgetrocknet und nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Die drei verbleibenden Objektträger werden nach dem Ausstreichen à priori mit einem alkoholischen Fixationspray, einer Modifikation des Delaunay-Fixativs fixiert und anschließend nach Papanicolaou gefärbt (s. u.). Diese Färbung wird standardisiert in einem Färbeautomaten vorgenommen (Abb. 4). In der darauf folgenden Abbildung sind noch einmal die präparatorischen Schritte in ihrem Ablauf zusammengefasst (Abb. 5).



Abb. 4: Färbeautomat am Schwerpunkt für Cytopathologie für automatisierte und standardisierte zytologische Färbungen.

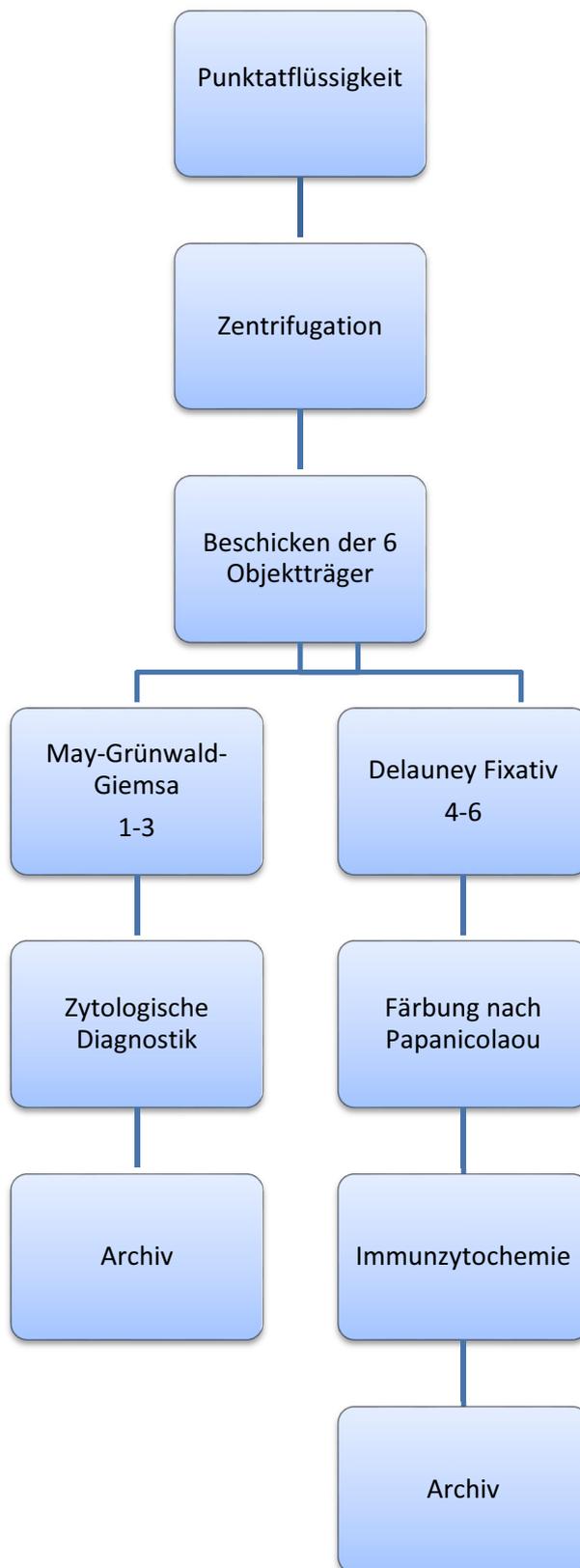


Abb. 5: Präparationsschema zur Herstellung von Ausstrichpräparaten seröser Perikardergüsse für eine zytologische und immunzytochemische Untersuchung am Schwerpunkt für Cytopathologie.

May-Grünwald-Giemsa-Färbung (MGG-Färbung)

Die May-Grünwald-Giemsa-Färbung setzt luftgetrocknete Präparate voraus, deren Färbung während fünf Minuten in einer standardisierten Methylenblau-Lösung (May-Grünwald-Lösung) beginnt (s. Tabelle 5). Hieran schließt sich eine zweifache Spülung in einer leicht sauer (pH-Wert 6,8) gepufferten wässrigen Lösung an. Danach wird ein zweiter Färbeschritt in einer standardisierten Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung (Giemsa-Lösung) während 15 Minuten vorgenommen und erneut zweimal in der gepufferten wässrigen Lösung gespült, sodann erfolgt die Eindeckelung der Präparate.

Tabelle 5: Schema der Färbung nach May-Grünwald-Giemsa am Schwerpunkt für Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf.

Einwirkzeit	Reagenzien
5 Minuten	Eosin-Methylenblau-Lösung
1 Minute	wässrige Spülung (pH 6,8)
1 Minute	wässrige Spülung (pH 6,8)
15 Minuten	Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung
1 Minute	wässrige Spülung (pH 6,8)
1 Minute	wässrige Spülung (pH 6,8)

Nach dieser Färbung erscheint, wie auf dem folgenden Foto ersichtlich, das Zytoplasma in Blau-Tönen, während sich der Kern in Violett-Tönen anfärbt (vgl. Abb. 6). Auch dieses Foto ist exklusiv im Institut für Pathologie, auf Basis des vorliegenden Patientenkollektivs entstanden. Die Zellen unterliegen durch die Lufttrocknung einer schwächeren Schrumpfung, als bei der Papanicolaou-Färbung.

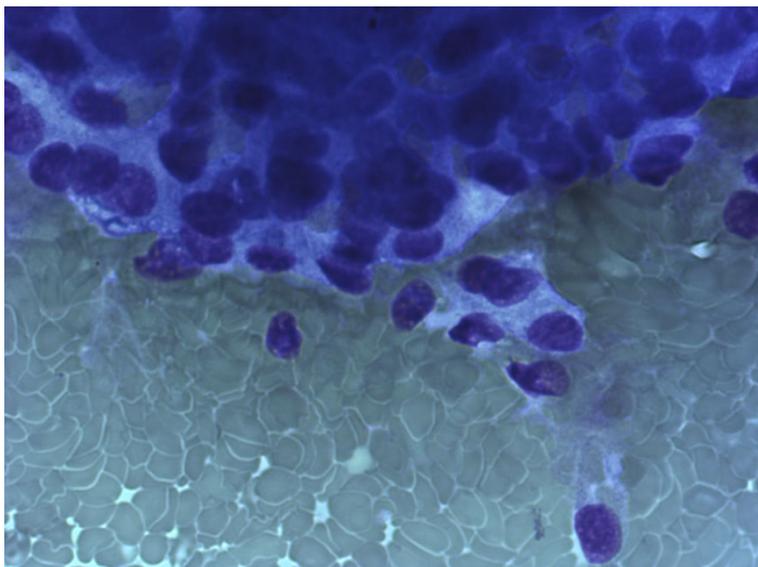


Abb. 6: Gutartiger Perikarderguss, MGG-Färbung, 400-fach vergrößert.

Die Papanicolaou-Färbung

Diese Standardfärbung für alkoholfixierte zytologische Präparate geht auf den gleichnamigen US-amerikanisch-griechischen Pathologen George Papanicolaou zurück und wird am Schwerpunkt für Cytopathologie standardisiert in einem Färbeautomaten durchgeführt. Zunächst durchlaufen die Präparate eine Alkoholreihe absteigender Konzentration, beginnend mit 96%igem Ethanol und endend mit 50%igem Ethanol. Auf diese Weise werden die Präparate dem wässrigen Milieu angenähert, denn nur so kann die anschließende Färbung mit dem basischen Farbstoff Hämatoxylin erfolgen. Hämatoxylin färbt die negativ geladenen Phosphatgruppen der Zellkern-DNA. Im weiteren Verlauf wird überschüssiges Hämatoxylin mit Leitungswasser herausgewaschen, und die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe, beginnend mit 70%igem und endend mit 99,5%igem Ethanol, entwässert. Dieser Prozess ist erforderlich, um eine Färbung mit den hydrophoben Plasmafarbstoffen zu ermöglichen. Bei der Plasmafärbung richtet sich die Einwirkzeit nach dem gewünschten Farbton. Auf Grund der vorwiegend basischen Reaktion des Zytoplasmas werden vorwiegend saure Farbstoffe wie z.B. Orange G angewandt. Danach wird durch Xylol der Alkohol ausgewaschen und folgend das Xylol durch Voclear ersetzt. Nachfolgend ist in Tabelle 6 das Färbeschema der Papanicolaou-Färbung wiedergegeben:

Tabelle 6: Schema der Färbung nach Papanicolaou am Schwerpunkt für Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf.

Einwirkzeit	Reagenzien
2 Minuten	96% Ethanol
1 Minute	96% Ethanol
1 Minute	70% Ethanol
1 Minute	50% Ethanol
1 Minute	Aqua dest
2 Minuten	Hämatoxylin
3 Minuten	Leitungswasser
3 Minuten	Leitungswasser
1 Minute	NH ₂ OH
1 Minute	70% Ethanol
1 Minute	70% Ethanol
1 Minute	80% Ethanol
1 Minute	96% Ethanol
2 Minuten	Orange II 2b
1 Minute	96% Ethanol
1 Minute	96% Ethanol
2 Minuten	Polychrom 3b
1 Minute	96% Ethanol
1 Minute	96% Ethanol
2 Minuten	99,5% Ethanol
1 Minute	Xylol
1 Minute	Xylol
1 Minute	Voclear
1 Minute	Voclear

2.2.3 Zytologische Kriterien für Malignität

Die Klassifikation und Identifikation für Malignität in Ergüssen basiert auf fundierten zytologischen Beurteilungskriterien, die in der Fachliteratur bereits vielfach Erwähnung fanden (Bibbo, 1997; Dannenberg, 2015; Koss, 2006). Dabei handelt es sich insbesondere um folgende zehn Kriterien (vgl. Abb.7):

1. Nachweis von Zellverbänden
2. Exzentrische Lokalisation von Zellkernen
3. Zugunsten der Kerne verschobene Kern- Plasma-Relation
4. Anisonukleose (unterschiedliche Größe der Zellkerne)
5. Kernpolymorphie (Vielgestaltigkeit der Zellkerne)
6. Überlappung von Zellkernen
7. Irregularität der Zellkernmembran
8. Hyperchromasie und Anisochromasie
9. Vergrößerung des Chromatinmusters
10. Vermehrung und Vergrößerung von Nukleolen

In folgender Abbildung ist ein Ausstrichpräparat eines malignen Perikardergusses dargestellt. Das Foto ist exklusiv im Institut für Pathologie entstanden, der Ausstrich entstammt dem vorliegenden Patientenkollektiv. Die oben beschriebenen zytologischen Kriterien für Malignität sind ersichtlich.

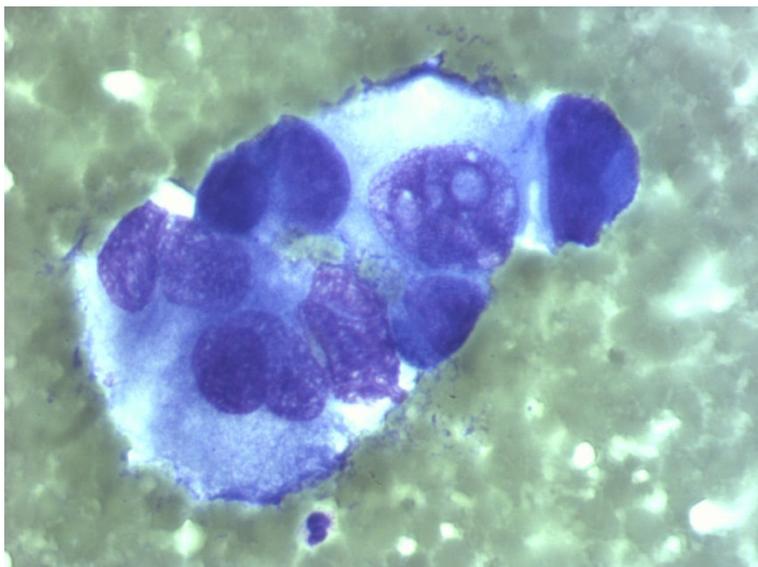


Abb. 7: Maligner Perikarderguss, MGG-Färbung, 400-fache Vergrößerung.

2.2.4 Diagnostische Klassifikation

Die diagnostische Klassifikation bezüglich der Auswertung der Ergusszytologie erfolgt nach einer standardisierten Nomenklatur der Deutschen Gesellschaften für Pathologie und für Zytologie, die auf Böcking und Freudenberg zurückgeht (Böcking & Freudenberg, 1998).

Danach werden die zytologischen Diagnosen in folgende fünf Kategorien eingeteilt.

1. „Tumorzell-positiv“
2. „dringender Verdacht“
3. „zweifelhaft“
4. „Tumorzell-negativ“ (keine Tumorzellen)
5. „unzureichendes Zellmaterial“

Zu 1.) In „tumorzell-positiven“ Präparaten, sind eindeutig Zellen einer Neoplasie nachweisbar. Bei Präparaten der Kategorie 1 kann mittels immunzytochemischen Untersuchungen eine Typisierung des Tumors versucht werden. Auf diese Weise kann in vielen Fällen der zugrunde liegende *Primarius* bestimmt werden. Da maligne

Perikardergüsse oft von Bronchialkarzinomen oder Mammakarzinomen herrühren, werden vorzugsweise Marker wie CK7, CK5/6, CK20, sowie TTF1 eingesetzt.

Zu 2.) Als „dringend verdächtig“ werden Ausstriche bezeichnet, bei denen die Existenz maligner Zellen wahrscheinlich ist. Um eine eindeutig „positive“ Diagnose zu stellen, liegen hier zu spärlich maligne Zellen vor oder die zytologischen Beurteilungskriterien für Malignität sind nicht hinreichend erfüllt (s. Kapitel 2.2.3).

Zu 3.) „Zweifelhaft“ lautet die Diagnose in Fällen, bei denen maligne Zellen nicht gewiss auszuschließen sind. Die Präparate zeigen abnorme, atypische Zellen, die auf eine Dysplasie hinweisen können.

In den Präparaten der Kategorie 2 und 3, in denen man Tumorzellen für möglich hält, wird zu ihrem Nachweis oder zu ihrem Ausschluss eine Anwendung der immunzytochemischen Marker BerEP4 und HEA 125 angestrebt.

Zu 4.) In „Tumorzell-negativen“ Präparaten, sind keine Tumorzellen nachweisbar. In dieser Gruppe befinden sich unter anderem hämorrhagische und entzündliche Ergüsse.

Zu 5.) Als „unzureichend“ für eine Diagnose werden die Ausstriche eingeordnet, die keine Zellen oder zu wenige Zellen bzw. autolytisches Zellmaterial enthalten, also nicht repräsentativ sind.

2.2.5 Immunzytochemische Untersuchung

Immunzytologie dient dem spezifischen Nachweis von Antigenen im Zytoplasma, der Zellmembran oder dem Zellkern durch eine spezifische Antikörper-Markierung. Dafür können monoklonale, spezifisch gegen eine einzige Antigen determinante gerichtete, und polyklonale, mit verschiedenen Antigen determinanten reagierende, Antikörper zum Einsatz kommen. Da Antikörper selbst nicht sichtbar sind, müssen sie für die immunzytologische Verwendung markiert werden. Dabei kommen Substanzen, wie Fluorchrome (Coons, 1958), verschiedene Enzyme (Avrameas, 1969; Nakane & Kawaoi, 1974) oder kolloidales Gold (De Mey et al., 1981; Faulk & Taylor, 1971) zum Einsatz, die

an die Antikörper gekoppelt werden. Diese Substanzen sind entweder selbst farbig oder vermitteln eine Anfärbung über eine spätere Indikatorreaktion.

Für die folgende (immunologische) Färbung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die über Jahre stets weiter entwickelt wurden (Chan, 2000). So zum Beispiel die direkte und indirekte Methode (Coons et al., 1955), die Methode des „markierten Antigens“ (Beutner et al., 1965; D. Y. Mason & Sammons, 1979) sowie die Immunglobulin-Enzym-Brücken-Technik von Mason (1969). Als Weiterentwicklung folgte die Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode nach Sternberger (Sternberger et al., 1970), kurz PAP-Methode. In den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts etablierte sich für die alkalische Phosphatase die APAAP-(Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) Methode nach Cordell (1984).

Daneben existieren auch Methoden, die auf der Wechselwirkung von Avidin (Hühnereiweiß) und Biotin beruhen. Die hoch praktikablen und sensitiven Avidin-Biotin-Methoden nutzen die starke und nahezu irreversible Bindung zwischen Biotin und Avidin. Diese Affinität ist viel stärker als die Antigen-Antikörper-Interaktion (Green, 1963; Hastka, 1997). Von besonderer Bedeutung ist dabei laut Hastka (1997), dass Avidin vier Bindungsstellen für Biotin besitzt und die meisten Proteine und Enzyme mit mehreren Biotinmolekülen konjugiert werden können. Durch diesen Verstärkereffekt (vgl. Abb. 8) können makromolekulare Komplexe zwischen Avidin und dem biotinyliertem Enzym gebildet werden. Auf diese Weise wird das nachzuweisende Antigen nicht singulär, sondern durch ein komplexes Netzwerk aus biotinylierten Enzymen und Avidin markiert (Hastka, 1997).

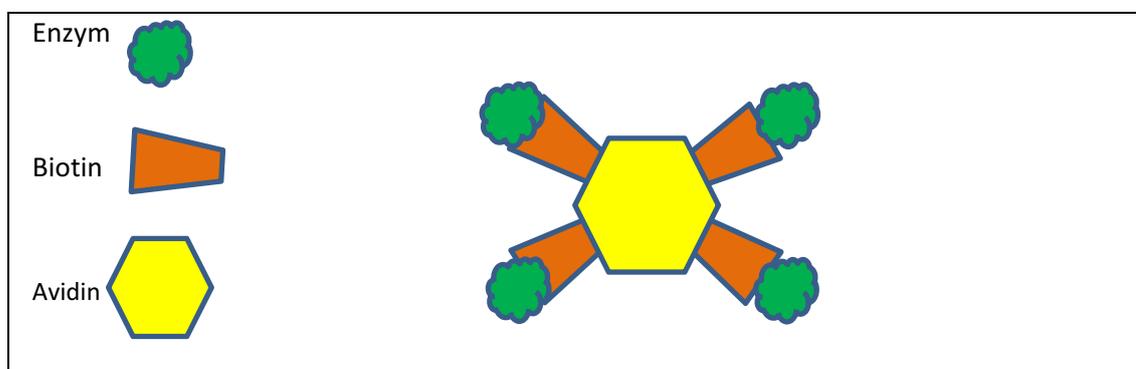


Abb. 8: Verstärkungsprinzip der Avidin-Biotin Methode Darstellung modifiziert nach Hastka (1997).

Das zweischrittige Verfahren nach Clark und Todd ist die simpelste Methode, welche die beschriebene Avidin-Biotin-Interaktion ausnutzt (Clark & Todd, 1982; Hastka, 1997). Hierbei wird ein biotinylierter Primärantikörper im zweiten Schritt durch Avidin nachgewiesen, jedoch muss bei dieser Methode der Primärantikörper in konjugierter Form vorliegen, was das Verfahren aufwendiger und kostenintensiver gestaltet (Hastka, 1997).

Daher hat es sich als folgerichtig erwiesen, ein dreischrittiges Verfahren zu verwenden, bei dem erst der zweite Antikörper biotinyliert wird und dadurch der primäre Antikörper nicht in konjugierter Form vorliegen muss. Zwei Methoden wenden dieses Prinzip an: die LAB-(Labeled-Avidin-Biotin-) Methode nach Warnke und Levy (1980) und die im Rahmen der Studie verwendete ABC-(Avidin-Biotin-Komplex-) Methode nach Hsu (Hsu & Raine, 1981; Hsu et al., 1981a, 1981b). In einer immunhistologischen Studie aus den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts wird die LAB-Methode als empfindlicher beschrieben (Giorno, 1984). Die Ursache hierfür wird laut Hastka (1997) in der beträchtlichen Größe des ABC-Komplexes begründet. In der Immunzytologie wird die ABC-Methode jedoch als das empfindlichste Verfahren überhaupt eingestuft, nach Hastka (1997) und einer Studie von Hsu (1981b) ist sie fünfmal sensitiver als die PAP-Methode.

Bei der ABC-Methode wird zunächst das Antigen mit dem Primärantikörper markiert, anschließend wird ein biotinylierter, also kovalent an Biotin gebundener Sekundärantikörper, zugegeben, der sich an den Primärantikörper koppelt. Im dritten Schritt reagiert der Komplex aus Avidin, Biotin und Enzym mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Hastka, 1997). Das Avidin-Biotin-Verhältnis ist laut Hastka (1997) möglichst so zu wählen, dass an jedem Avidin drei Peroxidase-Enzyme über Biotin gebunden sind und die vierte Biotinbindungsstelle zunächst aufnahmebereit bleibt. Über diese vorübergehend freie Stelle erfolgt dann (wie in Abb. 9 ersichtlich) die Kopplung an den biotinylierten Sekundärantikörper (Hastka, 1997). Eine zusätzliche Qualität dieser Methode ist die Tatsache, dass unspezifische Färbungen annähernd nicht zustande kommen. Das ist zum einen der hohen Affinität des Avidins zum Biotin geschuldet, zum anderen spielt auch die Abwesenheit endogener Avidinbindungsstellen der meisten Gewebe eine tragende Rolle (Giorno & Kohler, 1983; Hastka, 1997).

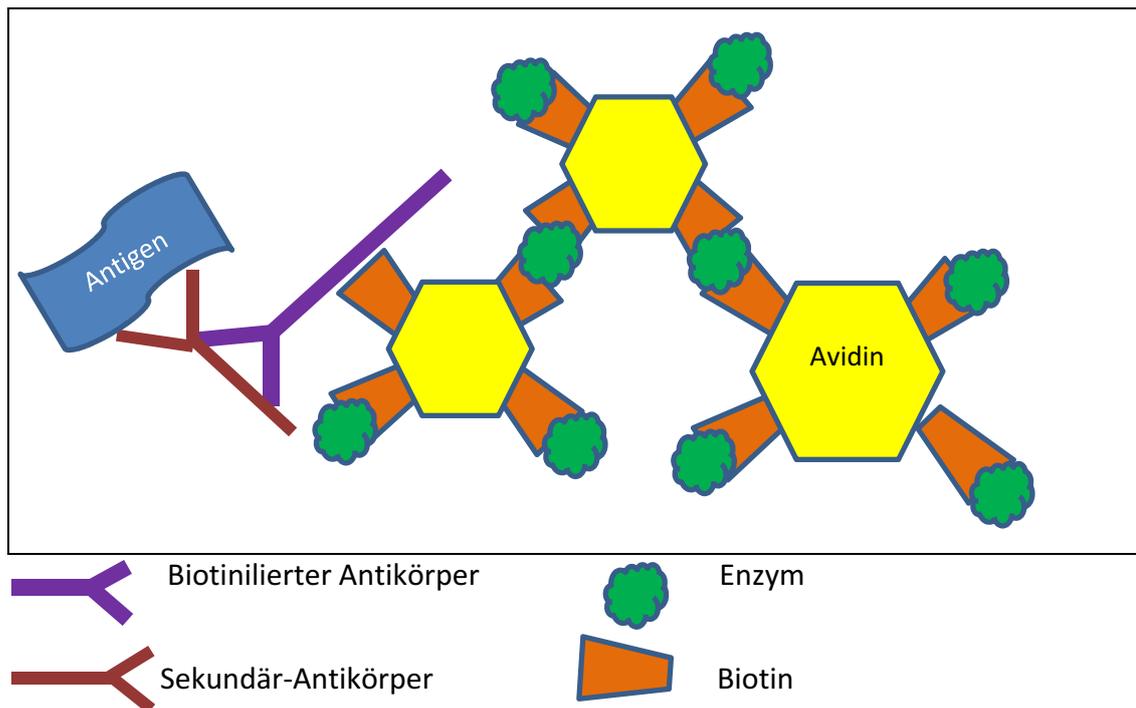


Abb. 9: ABC-Technik modifiziert nach Hastka und Joppien (Hastka, 1997; Joppien, 2011).

Die immunzytochemische Laboruntersuchung erfolgt an Präparaten, die (vgl. Kapitel 2.2.2) durch Alkohol fixiert und nach Papanicolaou gefärbt sind. Während der mikroskopischen Diagnostik werden auffällige Zellgruppen mit einem wasserfesten Schreiber auf dem Deckglas markiert. Nach Abschluss der Untersuchung werden die Konturen der Markierungen mit einem Kopierer auf Papier dokumentiert. Danach erfolgt basierend auf einer Studie von Dalquen (1993) die Anwendung der ABC-Methode.

Wie in Tabelle 7 ersichtlich beginnt die Vorbehandlung mit der Entfernung des Eindeckmediums und des Farbstoffes, dazu absolvieren die Präparate für jeweils 10 Minuten zwei Xylobäder. Es schließen sich Ethanolbäder in absteigender Konzentration von 100% bis 96%, mit jeweils 10 minütiger Verweildauer an. Bei Kernantikörpern, wie TTF-1 und CDX-2, ist als additiver Zwischenschritt eine 20 minütige Hitzebehandlung bei 80 Grad Celsius erforderlich, während bei zytoplasmatisch bindenden Antikörpern direkt die Hemmung der endogenen Peroxidase folgt. Dies ist erforderlich, um eine Umwandlung des Substrates durch endogene - also in den Zellen enthaltene Peroxidasen - zu inhibieren (Hastka, 1997). Dazu werden die Präparate in

einer von Streefkerk entwickelten Mischung aus Methanol und H_2O_2 inkubiert (Streefkerk, 1972).

Nachfolgend schließen sich mehrere Spülvorgänge an, um das Methanol zu entfernen. Danach erfolgt die Inkubation in Normalserum für einen Zeitraum von 20 Minuten. Im Anschluss werden die Objektträger mit dem Primär-Antikörper für 12 Stunden bei 25 Grad Celsius inkubiert und zweimalig mit 0,5 M TRIS (tris-(hydroxymethyl) aminomethan) gespült. Im weiteren Verlauf werden die Objektträger mit dem Sekundär-Antikörper 30 min während inkubiert und ebenfalls einem zweimaligen Waschvorgang mit 0,5 M TRIS unterzogen. Äquivalent zu dem vorherigen Schritt findet eine 30 minütige Inkubation mit ABC-Elite-Standard statt, bevor die Präparate erneut in 0,5 M TRIS-Puffer dem wiederholten Waschvorgang unterzogen werden. Exogene Peroxidasen, wie im ABC-Komplex verwendet, katalysieren die Oxidation eines Substrates durch Wasserstoffperoxid (Hastka, 1997). Das am Schwerpunkt für Cytopathologie, verwendete chromogene Substrat ist das von Graham et al. (1965) beschriebene AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol), eben dieses wird im folgenden Schritt für 40 Minuten appliziert. Nach erneutem Spülen folgt dann die Gegenfärbung mit Mayers Hämatoxylin, dadurch ist mikroskopisch eine bessere Abgrenzung und Identifizierung der Zellen gesichert. Die genauen Zeiten, Substrate und Zwischenschritte sowie Substratdosierungen sind in der folgenden Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Immunzytochemisches Färbeprotokoll des Schwerpunkts Cytopathologie an der Universitätsklinik Düsseldorf.

Färbeprotokoll für die Immunzytochemie nach der ABC-Methode		
Schritte	Reagenz	Zeit
1	Xylol	2 mal 10 Minuten
2	Ethanol 100%	10 Minuten
3	Ethanol 100%	Ethanol 100% 10 Minuten
4	Ethanol 96%	10 Minuten
5	Ethanol 96%	10 Minuten
6 Hitzebehandlung - additiver Zwischenschritt bei Kernantikörpern -	PBS-Puffer Citratpuffer Objektträger im Wasserbad Objektträger abkühlen lassen PBS-Puffer	5 Minuten 20 Minuten 20 Minuten 5 Minuten
7 Stoppen der endogenen Peroxidase	1 ml H ₂ O ₂ (30 % Perhydrol) auf 100 ml Methanol	30 Minuten
8 Stoppen der endogenen Peroxidase	3mal mit PBS Puffer spülen	
9 Waschvorgang	PBS-Puffer	2 mal 10 Minuten
10 Inkubation 1.Tag	Normalserum Primär-Antikörper	Normalserum 20 Min 12h bei 25°C
11 Waschvorgang	Tris 0,5M in PBS 1:10	2 mal 5 Minuten
12 Inkubation 2.Tag	LINK (Sekundäntikörper)	30 Minuten
13 Waschvorgang	Tris 0,5M in PBS 1:10	2 mal 5 Minuten
14 Inkubation 2.Tag	ABC-Elite Standard	30 Minuten
15 Waschvorgang	Tris 0,5M in PBS 1:10	2 mal 5 Minuten
16 Substrat- Chromogen- Reagenz	AEC	40 Minuten
17 Spülvorgang	Destilliertes Wasser	2 mal 5 Minuten
18 Gegenfärbung	Mayer Hämatoxylin	1 Minute
19 Waschvorgang	fließendes Wasser	10 Minuten
20 Eindecken mit Aquatex		

PBS: phosphate buffered saline; AEC: (3-Amino-9-ethylcarbazol); ABC: Avidin - Biotin-Komplex; TRIS: tris (hydroxymethyl) aminomethan

2.2.6 Einsatz der Immunzytochemie in der Erkennung einer Karzinose

Wie im Kapitel Zielsetzung bereits geschildert, bestehen zwei Hauptindikationen zum Einsatz der Immunzytochemie der Ergüsse, zunächst wird der Einsatz der Immunzytochemie zur Erkennung einer Karzinose genauer beleuchtet.

Fälle, die „dringend verdächtig“ oder „zweifelhaft“ eingestuft wurden, werden auf das Vorliegen epithelialer Tumorzellen untersucht. Hierzu dienen als Primärantikörper:

- BerEP4, ein monoklonaler Antikörper, der zur Differenzierung von Adenokarzinomen und malignen Mesotheliomen dient (Ordonez, 2002; Yaziji et al., 2006). Eine Studie aus den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts zeigte, dass 87% der Adenokarzinome eine positive Reaktion auf BerEP4 aufwiesen; bei Mesotheliomen hingegen nur bei 1% der Fälle (Sheibani et al., 1991).
- HEA125, ein monoklonaler Antikörper, der zur Detektion von Karzinomen genutzt wird. Der Marker zeigt ein breites positives Reaktionsspektrum mit einer Fülle humaner Epithelien und epithelialer Tumoren. Studien zufolge zeigen Karzinome eine stark positive Reaktion, während Sarkome, Lymphome, Melanome und neurogene Tumoren nicht angefärbt werden (Moldenhauer et al., 1987). In Einzelfällen dient HEA 125 auch als Gegenprobe.
- Anti-Calretinin, ein polyklonaler Antikörper, der eine Unterscheidung von reaktiven Mesothelzellen oder Mesotheliomen (etwa 80% positiv) von Karzinomen im Perikarderguss ermöglicht. In einer Studie von Doglioni et al. (1996) konnte für die Detektion von Mesotheliomen eine Sensitivität von 100% erzielt werden. Ebenso ist eine Abgrenzung zu Adenokarzinomen (z.B. der Lunge) möglich, diese reagieren in der Regel negativ (Chhieng et al., 2000; Miettinen & Sarlomo-Rikala, 2003).

Der Nachweis einer überzeugenden BerEP4- bzw. HEA125-Expression wird dabei als Evidenz für epitheliale Tumorzellen, also für das Vorliegen einer Ergusskarzinose, interpretiert. Calretinin-Positivität wird als charakteristisch für Mesothelzellen angesehen und spräche somit gegen eine Karzinose, ohne dass eine Calretinin-Expression zwischen einer reaktiven (gutartigen) oder einer bösartigen Mesothelzellveränderung (malignes Mesotheliom) unterscheiden ließe. Da in seltenen Fällen auch Ko-

Expressionen von BerEP4 / HEA 125 mit Calretinin oder gar paradoxe Färbemuster auftreten können, muss die Interpretation stets im Kontext mit dem gesamten morphologischen Bild erfolgen.

2.2.7 Einsatz der Immunzytochemie in der Typisierung einer Karzinose

Der Einsatz der Immunzytochemie in einer Markerkombination ermöglicht ferner die Zuordnung ortsfremder epithelialer Zellen zu einem bestimmten Herkunftsorgan, sodass die Methode auch zur Tumortypisierung genutzt werden kann, und zwar in erster Linie an bereits „tumorzell-positiv“ diagnostizierten Fällen. Hier kommen folgende Antikörper zum Einsatz (Ackerman, 1996; Ackerman & Ackerman, 1996; Geisinger, 2004; Shidham & Atkinson, 2007):

- Anti-CK 5/6: Dient dem Nachweis der basischen Zytokeratine 5 und 6. Studien zufolge zeigt sich eine Positivität von bis zu 100% für Pankreas-, 78% für Magen- und 77% für Mammakarzinome (Pomjanski et al., 2005). Außerdem dient CK 5/6 als differentialdiagnostischer Marker zur Differenzierung von Adenokarzinomen der Lunge (meist negativ) und malignen Mesotheliomen (meist positiv) (Ordonez, 1998).
- Anti-CK 7: Dient dem Nachweis des basischen Zytokeratins 7, welches von glandulären Epithelien und Übergangsepithelien exprimiert wird.
- Anti-CK 20: Dient dem Nachweis des sauren Zytokeratins 20, welches wie CK7 von vielen glandulären Epithelien und Übergangsepithelien exprimiert wird. Chu et al. (2000) zeigte eine CK-20-Positivität in approximativ allen kolorektalen Karzinomen seiner Studie. Bei Metastasen eines Adenokarzinoms mit unbekanntem *Primarius* können das Anfärbeergebnis von CK7 und CK20 und die Anwendung des Algorithmus zur diagnostischen Interpretation (vgl. Abb.10) einen entscheidenden Hinweis auf die Primariuslokalisation geben.
- Anti-TTF-1: Der Thyroid-Transkriptionsfaktor wurde zunächst in Zellen der Schilddrüse und später in pulmonalen Zellen nachgewiesen (Lau et al., 2002). Naturgemäß wird es von den meisten Karzinomen der Schilddrüse exprimiert, dient aber differential-diagnostisch als Marker für Adenokarzinome der Lunge

(Nakamura et al., 2002; Ordonez, 2000a). Zahlreiche Studien haben bereits die diagnostische Treffsicherheit von TTF-1 bei primären und metastasierenden Lungenadenokarzinomen untersucht (Afify & al-Khafaji, 2002; Bingle, 1997; Kaufmann & Dietel, 2000; Ordonez, 2000b; Reis-Filho et al., 2000). In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass TTF-1 ein hoch spezifischer Marker zur Identifizierung von Lungenadenokarzinomen ist. Die ermittelten Sensitivitäten des Markers TTF-1 wurden mit 61,5%-89% angegeben. Die berichteten Werte für die Spezifität des Markers variierten zwischen 97%-100%.

- Anti-CA 125 (*Anti Cancer Antigen 125*): Dieser monoklonale Antikörper dient der Detektion von Adenokarzinomen des Ovars (Leake et al., 1994). Außerdem zeigt sich auch bei Adenokarzinomen anderer Organe, wie z.B. der Lunge, Schilddrüse (Keen et al., 1999), des Cervix sowie des gastrointestinalen Traktes eine positive Expression (Koelma et al., 1987; Loy et al., 1992), sodass er letztendlich nicht als organspezifisch gelten kann.
- Anti-CDX 2 ist ein hoch sensitiver Tumormarker zur Detektion kolorektaler Karzinome (Moskaluk et al., 2003), es wurde für Kolonkarzinome eine Sensitivität von 87,5% und Spezifität von 96,1% beschrieben (Barbareschi et al., 2003; Pomjanski et al., 2005; Tanaka et al., 2007).
- Anti-Mammaglobin dient der Detektion von metastasierenden Mammakarzinomen oder genitalen Karzinomen der Frau.
- Vimentin wird in einer Vielzahl von mesenchymalen und epithelialen Tumoren exprimiert und sein Nachweis kann so der Abgrenzung gegenüber Sarkomen dienen (Leader et al., 1987). Vimentin ist ebenso geeignet als interne Kontrolle, da es in vielen ortsständigen Geweben wie Endothelzellen, Fibroblasten und anderen mesenchymalen Elementen exprimiert wird. Außerdem ist sein Antigen so robust, dass man aus einer fehlenden Vimentin-Expression in den genannten Geweben auf einen technisch schlechten Gewebeerhalt schließen kann.
- Anti-EMA (epitheliales Membranantigen): Dieser Antikörper diente zwar ursprünglich dem Beweis des epithelialen Ursprungs von Tumoren, auch von Plattenepithelkarzinomen, ist aber inzwischen eher als „Zweitmarker“ von Mesothelien in Gebrauch, von welchen er recht regelmäßig exprimiert wird.

Eine gute Anfärbeprevalenz von malignen Zellen in serösen Ergüssen konnte in einer Studie von Al-Nafussi und Carder (1990) nachgewiesen werden.

- WT 1 (Wilms-Tumor-Protein) ist ein Transkriptionsfaktor der Niere, dessen Bezeichnung auf die Expression in Wilms Tumoren (Nephroblastomen) zurückgeht. Außerdem wird WT-1 von Mesotheliomen und serösen Ovarialkarzinomen exprimiert (Oates & Edwards, 2000; Shimizu et al., 2000). In einer Studie von Goldstein konnte gezeigt werden, dass 93% der serösen Ovarialkarzinome eine positive Reaktion auf Anti-WT1 zeigen (2001).
- PSA, das prostataspezifische Antigen, welches ein bedeutendes Zielantigen zur Diagnostik und Monitoring von Prostatakarzinomen darstellt, wird in Ergüssen im Grunde nur von Prostatakarzinomen exprimiert. Sodass dessen Nachweis in der Ergussdiagnostik eingesetzt wird, wenn eine Karzinose durch ein Prostatakarzinom in Betracht kommt.
- Anti-CD 20 ist ein Marker für B-Zell Lymphome, die meisten dieser Lymphome reagieren positiv.
- Anti-CD 45 ist ein Marker für Lymphome allgemein. Etwa 93-99% aller Lymphome sind positiv.
- Anti-CD 45 Ro ist ein spezifischer Marker für T-Tell-Lymphome (Arlettaz et al., 1999).
- BCL 2 (*B-cell lymphoma 2*) dient im Wesentlichen in der Histologie zur Differenzierung zwischen einem folliculären Lymphom und einer reaktiven folliculären Hyperplasie. In der vorliegenden Studie wurde der Antikörper in der Abklärung eines etwaigen synovialen Malignoms verwendet.
- HMB 45 ist ein monoklonaler Antikörper, der ursprünglich zur Unterscheidung von Melanomen und normalen Melanozyten eingesetzt wurde. HMB-45 wird insbesondere in der Diagnostik von malignen Melanomen und seinen Metastasen eingesetzt (Schwechheimer & Zhou, 1995).
- Anti-Melan A gibt Aufschluss über die melanozytäre Differenzierung von benignen und malignen Hauttumoren und Läsionen (Busam et al., 1998). Zur Detektion von Mesotheliomen ist es einer Studie von Ordonez et al. zufolge nicht geeignet (Ordonez et al., 2013).

- Anti-Pan Cytokeratin dient als Antikörper zur Abgrenzung von Karzinomen von Lymphomen und zur Identifikation von Karzinommikrometastasen in Lymphknoten. Die meisten Karzinome zeigen eine positive Reaktion.
- Synaptophysin ist ein hoch molekulares Transmembranprotein, das in normalen, reaktiven und neoplastischen Zellen neuroendokrinen oder neuroektodermalen Ursprungs exprimiert wird (Chejfec et al., 1987; Gould et al., 1987) und dessen Nachweis in der Ergussdiagnostik vor allem der Erkennung kleinzelliger neuro-endokriner Lungenkarzinome dient.

In der folgenden Tabelle sind die im Rahmen der Studie am häufigsten verwandten Antikörper hinsichtlich Gewicht, Bindung, Art, Verdünnung, Hersteller und Klon näher spezifiziert:

Tabelle 8: Spezifikationen der Antikörper, die im Rahmen der vorliegenden Studie am Schwerpunkt für Cytopathologie Düsseldorf am häufigsten benutzt worden sind.

Antikörper, Gewicht, Bindung	Art, Verdünnung, Hersteller, Klon
TTF1 Thyroid- Transkriptionsfaktor Bindung: intranukleär	monoklonal, 1:200, Arcis, Hiddenhausen, Nr.DM 285, Klon 8G7G3/1
CDX2 intestinal-spezifischer- Transkriptionsfaktor; Homeobox- Gen Bindung: intranukleär	monoklonal, 1:5000, BioGenex, The Hague, Nr.MU 392-UC, Klon CDX2-88
CK5/6 Basistyp Zytokeratin, 58 kDa Bindung: intrazytoplasmatisch	monoklonal, 1:200, Dako, Glostrup, Nr.7237, Klon D5/16 B4
CK7 Basistyp Zytokeratin, 54 kDa Bindung: intrazytoplasmatisch	monoklonal, 1:1000, Dako, Glostrup, Nr.7018, Klon OV-TL,
CK20 intermediäres Filamentprotein, 46 kDa Bindung: intrazytoplasmatisch	monoklonal, 1:200, Dako, Glostrup, Nr.7019, Klon Ks 20.8
CA125 hoch molekulares GP, > 200 kDa Bindung: intrazytoplasmatisch	monoklonal, 1:1000, Dako, Glostrup, Nr.M 3519, Klon OC125
BerEP4 Epitheliales Antigen, 36 kDa Bindung: intrazytoplasmatisch	monoklonal, 1:200; Dako, Glostrup, Nr. M 0804, Klon BerEP4
HEA 125 Epithel-spezifisches GP, 34 kDa Bindung: intrazytoplasmatisch	monoklonal, 1:20-1:100, Biologo, Kronshagen Nr. HE100-2 , Klon: HEA125

kDa:Kilo-Dalton; GP: Glykoprotein

Zur Tumortypisierung besitzt die isolierte Betrachtung eines einzelnen Markers jedoch häufig keine hinreichende Aussagekraft, es bedarf daher der Beurteilung der gesamten angewandten Markerauswahl und auch bei dieser Indikation der Interpretation im gesamten morphologischen und klinischen Kontext. Am Schwerpunkt Cytopathologie in der Universitätsklinik Düsseldorf wurde basierend auf der Auswertung einer immunzytochemischen Studie (Pomjanski et al., 2005) von 101 tumorzell-haltigen serösen Körperhöhlenergüssen mit klinischem *Follow-Up* ein Algorithmus zur diagnostischen Interpretation der immunzytochemischen Färbeergebnisse entwickelt (Abb.10), der gute bis sichere Hinweise für eine Zuordnung von Adenokarzinomen zu einer Herkunft aus der Lunge, der Mamma, dem Ovar, dem Magen, dem Pankreas und dem Kolon bzw. Rektum erbringt.

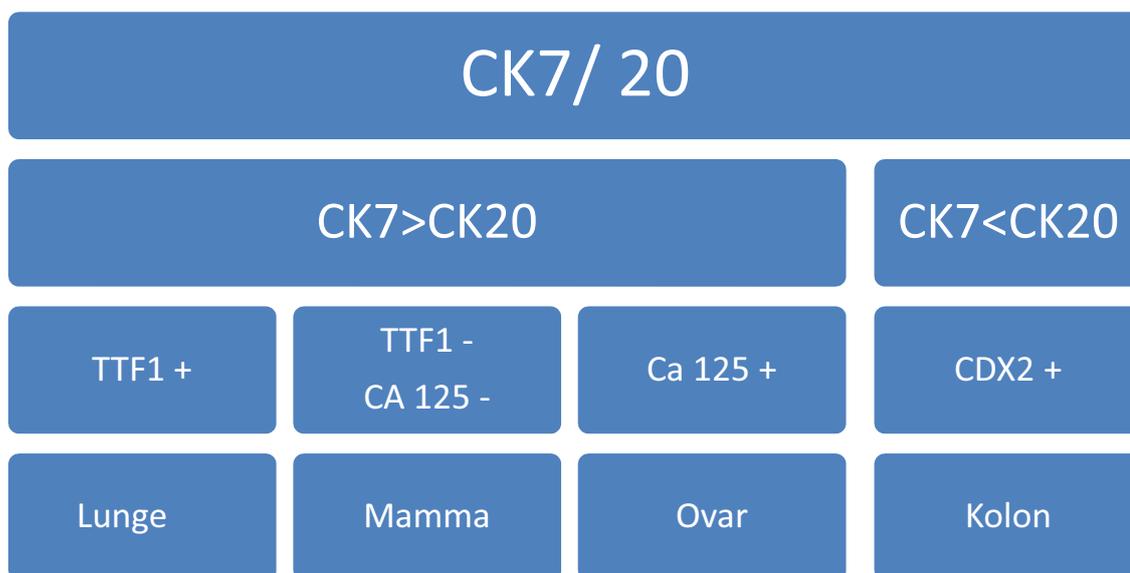


Abb. 10: Diagnostischer Interpretationsalgorithmus für Perikardergüsse bezogen auf Adenokarzinome. Modifiziert nach (Pomjanski et al., 2005). (+)= „positive“ Expression, (-) = „negative“ Expression ; im Vergleich zweier Marker stärkere (>) bzw. (<) schwächere Expression.

In den folgenden zwei Abbildungen ist einmal eine Anfärbung mit TTF-1, stellvertretend für intranukleär bindende Antikörper, und eine Anfärbung mit CK7, stellvertretend für intrazytoplasmatisch bindende Antikörper dargestellt. Die Fotografien sind exklusiv im Institut für Pathologie an Präparaten aus der hier vorliegenden Studie entstanden.

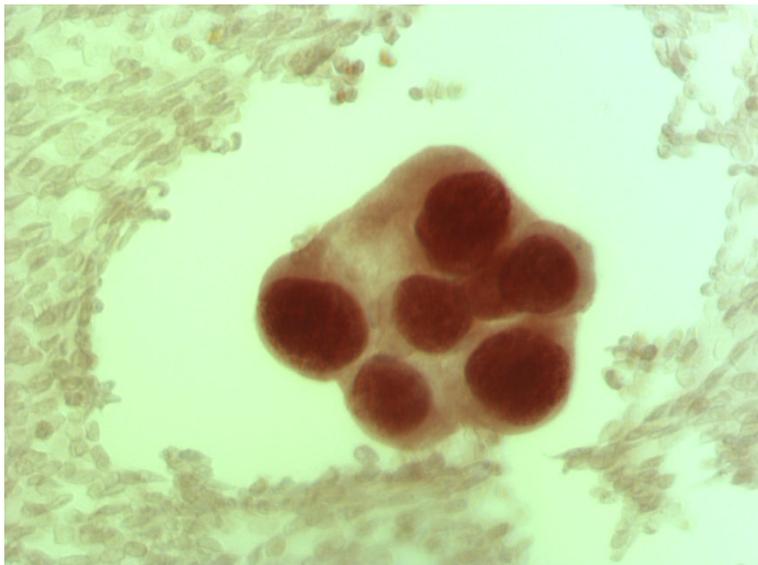


Abb. 11: Maligner Perikarderguss, TTF-1 „positiv“, 400-fach vergrößert.

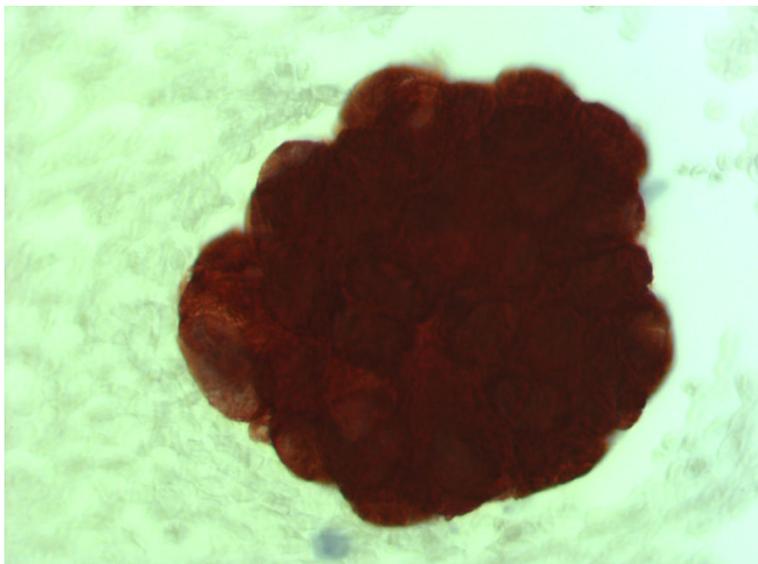


Abb. 12: Maligner Perikarderguss, CK 7 „positiv“, 400-fach vergrößert.

2.2.8 Einsatz der Immunzytochemie in der Planung einer adjuvanten Therapie bei einer Karzinose durch ein Mammakarzinom

Wurden indes Tumorzellen eines metastasierenden Mammakarzinoms durch vorherige Untersuchungen zweifelsfrei diagnostiziert, so bedarf es gelegentlich auch an Ergüssen, einer HER-2/neu-Bestimmung und einer Hormonrezeptoranalyse auf das Vorliegen einer Östrogen- bzw. Progesteronrezeptorexpression (ER, PR). Die Indikation hierzu wird aus dem klinischen Gesamtkontext gestellt und berücksichtigt, da die Untersuchungen am Primärtumor bereits verpflichtend durchgeführt worden sind, vor

allem den seit Entdeckung des Primärtumors vergangenen Zeitraum und die adjuvanten therapeutischen Ansätze der behandelnden Klinik. Diese könnten bei einer HER-2/neu-Positivität in der Gabe einer Trastuzumab-Antikörpertherapie („Herzeptin“) bzw. bei ER- und/oder PR-Positivität in der Anwendung einer antihormonellen Therapie bestehen.

2.2.9 Die Auswertung der immunzytochemisch gefärbten Präparate

Die Auswertung der Präparate erfolgt lichtmikroskopisch nach dem Prinzip der semiquantitativen Analyse. Dabei wird eine prozentuale Bestimmung des Anteils der angefärbten Tumorzellen und dementsprechende Einteilung nach *Score* durchgeführt (vor allem in Subkohorte 2). Jede Tumorzelle, die eine Färbung erkennen lässt, wird obgleich geringer Farbintensität als „positiv“ gewertet.

- Score 0 bedeutet, dass weniger als 10% der Tumorzellen eine Reaktion zeigten.
- Score 1 drückt aus, dass zwischen 11-20% der Tumorzellen angefärbt wurden.
- Score 2 heißt, dass zwischen 21-40% der neoplastischen Zellen eine Anfärbung aufwiesen.
- Score 3 zeigt bei zwischen 41-60% der malignen Zellen eine Färbung.
- Score 4 weist bei 61-80% der Tumorzellen eine Färbung auf.
- Score 5 zeigt zu 81-100% reaktive Tumorzellen.

Dieses Verfahren der semiquantitativen Diagnostik ermöglicht bei Betrachtung der gesamten Markerkonstellation die Befolgung des in Abbildung 10 gezeigten Algorithmus zur diagnostischen Interpretation der immunzytochemischen Färbeergebnisse. Bei wenigen Markern werden aus klinisch-praktischen Gründen andere Angaben als der *Score* bevorzugt. Da Angaben für Ki-67, einen Proliferationsmarker, sowie für den Östrogen- und den Progesteronrezeptor (ER, PR) in der Histologie üblicherweise als semiquantitative Zahlenangaben gemacht werden, geht man in der Zytologie analog vor; auf die gemäß dem immunreaktiven *Score* von Remmele und Stegner (1987) anzugebende Färbeintensität für ER und PR wird am Schwerpunkt für Cytopathologie aber verzichtet. Auch das in der Histologie verankerte

Scoring („DAKO-Score“) für die Bestimmung von HER-2/neu (*human-epidermal-growth-factor-receptor-2*) wird in der Zytologie analog gehandhabt.

2.3 Grundlagen der statistischen Datenanalyse

2.3.1 Kennzahlen der statistischen Datenanalyse

Die Auswertung der Daten des Patientenkollektivs erfolgt im weiteren Verlauf unter anderem nach einer speziellen Form der Kontingenztafel: der Vierfeldertafel (Hilgers, 2007). Anhand dieser können die statistischen Maßzahlen ermittelt werden, die zur Einschätzung der Treffsicherheit der zytologischen Diagnosen der Perikardergüsse dienen. Die Auswertung geschieht zur besseren Vergleichbarkeit in Anlehnung an die Parallelstudie (Dannenberg, 2015). Dabei werden verschiedene Kenngrößen berechnet, die auf die in Tabelle 9 dargestellte Vierfelder-Tafel zurückgehen.

Tabelle 9: Ergebnismatrix von Testinterpretationen in der Medizin. Modifiziert nach Hilgers (2007).

	Diagnostik +	Diagnostik -	Summe
Tumor +	Anzahl der richtig positiven (a)	Anzahl der falsch negativen (b)	Anzahl der tatsächlich positiven Fälle
Tumor -	Anzahl der falsch positiven (c)	Anzahl der richtig negativen (d)	Anzahl der tatsächlich negativen Fälle
Summe	Anzahl der positiv erkannten Fälle	Anzahl der negativ erkannten Fälle	Summe

Diagnostik +/-: Diagnose maligne/benigne; Tumor +/-: Tumor maligne/benigne.

Insgesamt wurden folgende Größen in Anlehnung an Hilgers (2007) bestimmt:

Unter der Sensitivität versteht man die (bedingte) Wahrscheinlichkeit für ein „positives“ Testergebnis unter den tatsächlich Erkrankten (Hilgers, 2007). Mit dieser statistischen Maßzahl wird die Anzahl richtig erkannter Kranker unter allen Erkrankten

ermittelt. Der Idealwert der Treffsicherheit liegt bei 100 %. Sie wird ermittelt durch:

$$\left(\frac{a}{a+b}\right)$$

Unter der Spezifität versteht man die (bedingte) Wahrscheinlichkeit für ein „negatives“ Testergebnis im Kollektiv der tatsächlich gesunden Patienten (Hilgers, 2007). Sie wird ermittelt durch

$$\left(\frac{d}{c+d}\right)$$

Die Falsch-Positiv-Rate gibt den Prozentsatz der als Tumor diagnostizierten neoplastischen Veränderungen an, die sich nachträglich als falsch herausstellen. Sie ergänzt sich mit der jeweiligen Spezifität zu 100 %. Sie wird ermittelt durch:

$$\left(\frac{c}{c+d}\right)$$

Die Falsch-Negativ-Rate ist die Rate mit den Tumoren, die fälschlicherweise nicht als solche diagnostiziert wurden. Anders ausgedrückt wird mit der Falsch-Negativ-Rate der Prozentsatz übersehener Kranker ermittelt. Sie ergänzt sich mit der Sensitivität zu 100 % und wird ermittelt durch:

$$\left(\frac{b}{a+b}\right)$$

Der positive Prädiktionswert ist ein prozentualer Vorhersagewert, der die (bedingte) Wahrscheinlichkeit angibt, erkrankt zu sein, sofern ein positives Testergebnis vorliegt (Hilgers, 2007). Er wird ermittelt durch:

$$\left(\frac{a}{a+c}\right)$$

Der negative Prädiktionswert gibt die (bedingte) Wahrscheinlichkeit an, gesund zu sein, im Falle eines negativen Testergebnisses (Hilgers, 2007). Er wird ermittelt durch:

$$\left(\frac{d}{b+d}\right)$$

Die Gesamttreffsicherheit gibt den Prozentsatz aller richtig positiven und richtig negativen erkannten Diagnosen, bezogen auf die Gesamtzahl aller Punktionen:

$$\left(\frac{a+d}{a+b+c+d}\right)$$

Die Auswertung der Treffsicherheit der immunzytochemischen Typisierung erfolgt nicht mit Hilfe der Vierfeldertafel, sondern durch selektive Bestimmung der Sensitivität, dem positiven Prädiktionswert, der Gesamttreffsicherheit und die Klassifikationsgenauigkeit. Diese gibt den Prozentsatz korrekt histogenetisch typisierter oder klassifizierter Tumoren an. Er definiert sich als der Quotient aus der Anzahl der korrekt typisierten „tumorzellpositiven“ Proben und der Gesamtzahl der Proben.

2.3.2 Definition der Wertungskategorien

Aufgrund der Tatsache, dass es neben „tumorzell-positiven“ und „tumorzell-negativen“ Befunden auch solche gibt, die als „zweifelhaft“ oder „dringend verdächtig“ klassifiziert worden sind, war es notwendig, Wertungskategorien zu entwickeln, d.h. die nicht eindeutigen Fälle für die Statistik als „positiv“ oder „negativ“ zu werten. Die Einteilung der Wertungskategorien findet in Anlehnung an die Parallelarbeit (Dannenberg, 2015) statt, sodass eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erwarten ist.

Wertungskategorie 1 (WK1):

Die „tumorzell-positiven“ und „dringend verdächtigen“ Fälle werden als „positiv“ gewertet. Die „tumorzell-negativen“ und „zweifelhaften“ Fälle werden als „negativ“ eingestuft. Dabei handelt es sich um den Normalfall.

Wertungskategorie 2 (WK2):

Die „tumorzell-positiven“, „dringend verdächtigen“ sowie die „zweifelhaften“ Fälle werden als „tumorzell-positiv“ betrachtet. Demnach werden nur die „tumorzell-negativen“ Studienfälle als „negativ“ hinsichtlich einer Neoplasie angesehen. Dabei handelt es sich um den Sonderfall.

2.3.3 Definition der Evidenzlevel

Durch das *Follow-Up* wurden die zytologischen Diagnosen durch klinische, radiologische und histologische Befunde verifiziert oder aber auch falsifiziert. Diese zusammengetragenen Befunde werden ihrer Wertigkeit entsprechend zur Qualitätssicherung in Evidenzlevel (EL) unterteilt, welche die Gewichtung der einzelnen Befunde und Zuverlässigkeit des erfolgten *Follow-Ups* ausdrücken. Bei den positiven Fällen findet eine Einteilung in 6 Level statt, Level 1 stellt hier die niedrigste, Level 6 die höchste Bewertungsstufe dar. Die negativen Fälle werden auch in Evidenzlevel eingeteilt, allerdings nur in 4 Evidenzlevel. Außerdem stellt hier Evidenzlevel 4 die höchste und 1 die niedrigste Stufe dar. Diese Art der Einteilung lehnt sich sowohl an den *Certainty*-Faktor (Sobin & Compton, 2010) als auch an zwei Doktorarbeiten aus dem Institut für Pathologie (Schwerpunkt Cytopathologie) der Universität Düsseldorf (Bölefahr, 2011; Dannenberg, 2015) an. Im Einzelnen sind die Stufen wie folgt zu unterscheiden.

Definition von richtig oder falsch positiven zytologischen Diagnosen:

Evidenzlevel 1:

- a) Aus dem Arztbrief geht die gleichstimmige Diagnose hervor, wie zuvor aus der zytologischen Befundung (positiv). Es erfolgte keine weitere Diagnoseabsicherung („*richtig positiv*“).
- b) Aus dem Arztbrief geht eine „negative“ Diagnose hervor, entgegengesetzt dem zytologischen Befund. Keine weitere Diagnostik widerlegt die zytologische Expertise („*falsch positiv*“).

Evidenzlevel 2:

- a) Aus dem Arztbrief geht die gleichgestellte „positive“ Diagnose hervor, indes mit bestätigtem *Follow-Up* („*richtig positiv*“).
- b) Aus dem Arztbrief geht eine vom zytopathologischen Befund abweichende, „negative“ Diagnose hervor; die Ätiologie der punktierten Raumforderung wurde geklärt („*falsch positiv*“).

Evidenzlevel 3:

- a) Ein wiederholter zytologischer Befund unterlegt den ursprünglichen zytologischen Befund („*richtig positiv*“).
- b) Ein wiederholter zytologischer Befund kommt im Vergleich zur ersten zytopathologischen Diagnose zu einem widersprüchlichen Ergebnis („*falsch positiv*“).

Evidenzlevel 4:

- a) Bildgebende Verfahren wie z.B. die Sonographie, Röntgen oder Szintigraphie bekräftigen die gestellte zytologische Diagnose („*richtig positiv*“).
- b) Bildgebende Verfahren widerlegen oder entkräften die zytologische Diagnose („*falsch positiv*“).

Evidenzlevel 5:

- a) Ein MRT und/oder CT untermauert die zytologische Diagnose („*richtig positiv*“).
- b) Bzw. widerlegt die zu Grunde liegende zytologische Diagnose („*falsch positiv*“).

Evidenzlevel 6:

- a) Die histologische Befundung eines Biopsats der tumorösen Veränderung untermauert die zytologische Diagnose („*richtig positiv*“).
- b) Bzw. widerspricht der zytologischen Diagnose („*falsch positiv*“).

Definition von richtig/falsch negativen zytologischen Diagnosen:Evidenzlevel 1:

- a) Der punktierte Erguss wurde im Arztbrief abschließend als „positiv“ beurteilt. Keine weitere Diagnostik entkräftet die zu vorige zytologische Diagnose („*falsch negativ*“).
- b) Der Erguss wurde im Arztbrief abschließend als „ungeklärt“ bewertet. Der Kliniker übernahm die Dignität des Prozesses aus dem zytologischen Gutachten („*richtig negativ*“).

Evidenzlevel 2:

- a) Der punktierte Erguss wurde im Arztbrief schlussendlich als positiv eingestuft, anknüpfende bildgebende Verfahren (Sonographie/Szintigraphie) oder weitere zytologische und histologische Befunde widersprechen der zytologischen Diagnose („*falsch negativ*“).
- b) Der Erguss wurde im Arztbrief abschließend als ungeklärt bewertet, jedoch pflichten weitere zytologische und/oder histologische Befunde der „negativen“ Diagnose bei („*richtig negativ*“).

Evidenzlevel 3:

- a) Der Erguss wurde im Arztbrief letztendlich als „positiv“ beurteilt. Ein CT und/oder MRT widerlegt die zytologische Diagnose („*falsch negativ*“).
- b) Der Erguss wird im Arztbrief als benigne betitelt („*richtig negativ*“).

Evidenzlevel 4:

- a) Die Ergussbildung wurde im Arztbrief abschließend als „positiv“ bewertet. Eine histologische Untersuchung des Geschehens widerlegt die zytologische Expertise („*falsch negativ*“).
- b) Die Ergussbildung wurde im Arztbrief abschließend als ungeklärt eingestuft, jedoch bekräftigen weitere Befunde, wie die der Zytologie, Histologie, Sonographie, Röntgen, MRT und/oder CT den zytopathologischen Befund, und/oder Bestätigung der zytopathologischen Diagnose durch negatives, mehrjähriges *Follow-Up* („*richtig negativ*“).

3 Ergebnisse

3.1 Einführung zur Datenauswertung

Basierend auf den geklärten Fällen erfolgt, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, im Ergebnisteil die detaillierte statistische Auswertung der unterschiedlichen Wertungskategorien (WK1 und WK2) hinsichtlich der „zweifelhaften“ zytologischen Untersuchungsergebnisse. Außerdem wurde das Patientenkollektiv in drei Subkohorten unterteilt.

Die Subkohorte 1 beinhaltet die Patientenfälle, bei denen zum Beweis von Tumorzellen oder zu ihrem Ausschluss eine Anwendung der immunzytochemischen Marker BerEP4 und HEA 125 angestrebt wurde. Für dieses Kollektiv wurden die in Kapitel 2.3.1 beschriebenen statistischen Kennzahlen berechnet, sowie eine detaillierte Auswertung mittels Vierfeldertafel vorgenommen.

Die Subkohorte 2 beinhaltet die Patientenfälle, bei denen Tumorzellen sicher waren, aber man mittels Typisierung Klarheit über den *Primarius* gewinnen wollte. Da maligne Perikardergüsse oft von Bronchial- und Mammakarzinomen herrühren, wurden hierfür vorzugsweise Marker wie CK7, CK5/6, CK20, TTF1 sowie ER und PR eingesetzt.

Subkohorte 3 beinhaltet die wenigen Fälle, bei denen eine Her-2/neu-Immunzytochemie Gegenstand der ergänzenden Untersuchungen war.

3.2 Allgemeine Datenauswertung der Studie

Von den 456 Patienten des Gesamtkollektivs wurden bei 84 Patienten immunzytochemische Untersuchungen vorgenommen. Aufgrund unzureichenden Untersuchungsmaterials für die immunzytologische Untersuchung mussten zwei Patienten von dieser Studie ausgeschlossen werden. Bei 6 Patienten (7%) konnte kein *Follow-Up* durchgeführt werden, da ihre Patientenakten – trotz wiederholter Bitten – von den jeweiligen Kliniken nicht zur Verfügung gestellt wurden (s. Abb. 13).

Damit standen 76 (91,%) Patienten mit 79 immunzytochemischen Untersuchungen für die statistische Auswertung zur Verfügung, die die Datengrundlage für die in dieser Studie durchgeführten statistischen Berechnungen bildeten. Unter den 79 immunzytochemischen Untersuchungen befanden sich 47 Untersuchungen mit Typisierungsmarkern und 29 Untersuchungen zwecks Beweis-/Ausschlussdiagnostik mit Markern wie BerEP4, sowie drei Her-2/neu Tests.

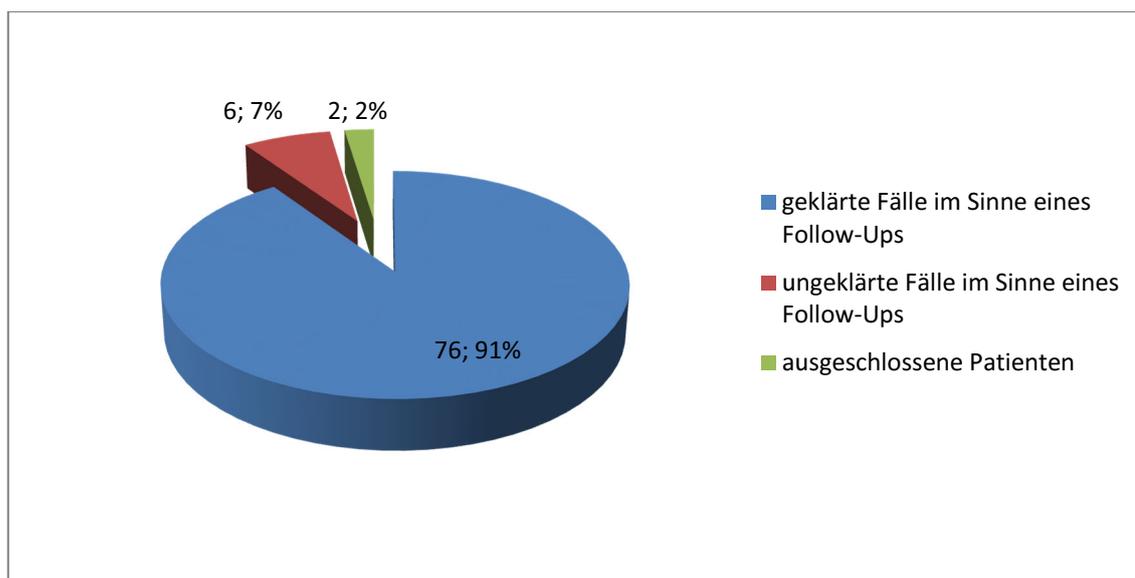


Abb. 13: Aufklärungsrate bezogen auf die Patientenzahl. Absoluter Zahlenwert; Prozentwert

In einer parallelen Studie wurde der dort zu Grunde liegende Patientenpool unter Anwendung der konventionellen zytologischen Diagnostik untersucht, dabei konnten von den 456 Patienten 424 Fälle vollständig geklärt werden (Dannenber, 2015). Da die vorliegende Studie, in Hinblick auf 76 Fälle, eine Teilbetrachtung des Gesamtkollektivs ist, wird dieses mit Genehmigung des Autors in Abbildung 14 kurz graphisch charakterisiert.

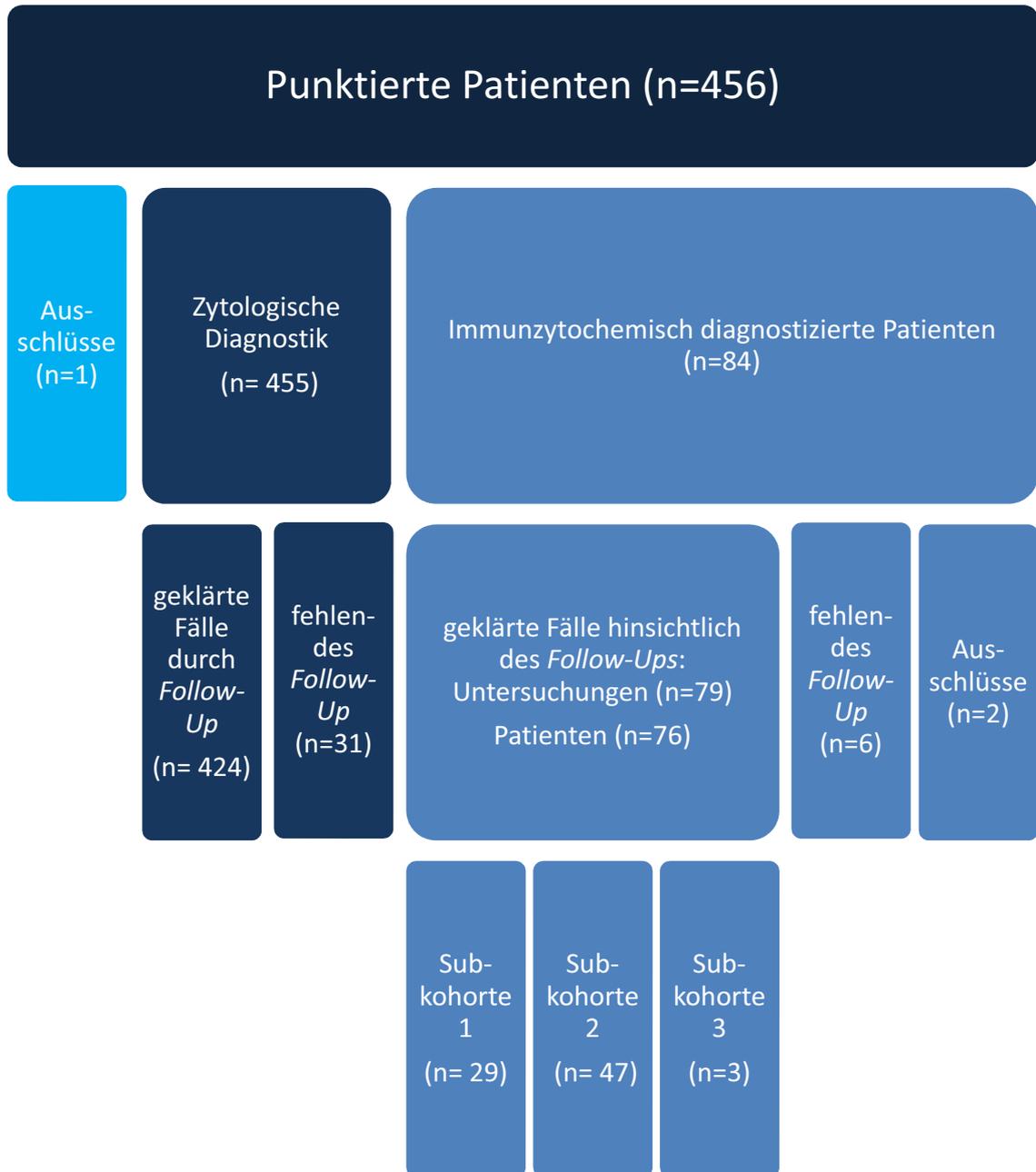


Abb. 14: Darstellung des gesamten Patientenkollektivs unter Berücksichtigung der Parallelstudie von Dannenberg (2015).

Bei den 76 Patienten dieser retrospektiven Analyse wurde eine konventionelle zytologische Diagnostik durchgeführt. Die Befunde dieser bereits erfolgten Diagnostik teilt sich wie folgt auf: 61% der Präparate wurden als „tumorzell-positiv“ eingestuft, bei 9% bestand der „dringende Verdacht“, bei weiteren 29% war die Diagnose „zweifelhaft“ und bei nur 1% waren die Proben als „negativ“ eingestuft (s. Abb. 15). In diesem einen konventionell zytologisch als „negativ“ befundeten Fall wurde die Immunzytochemie direkt mit der konventionellen Diagnostik angeordnet.

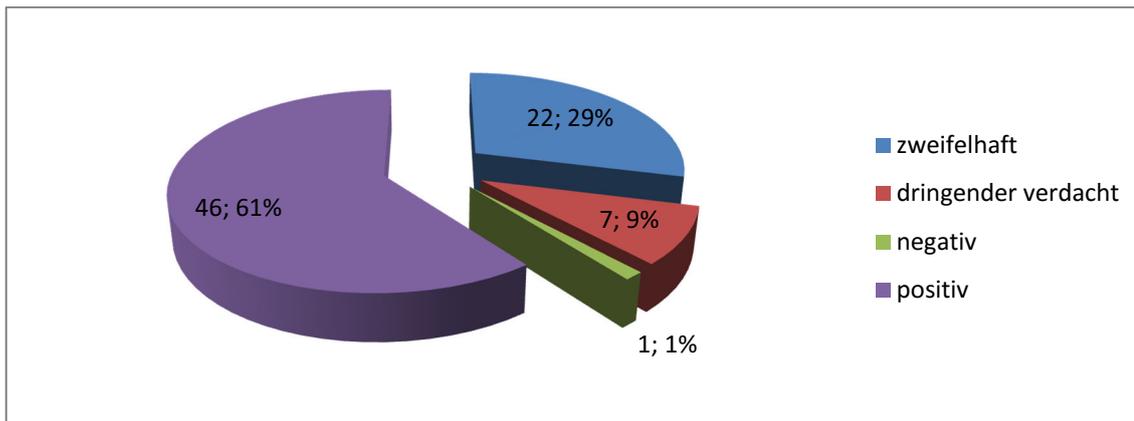


Abbildung 15: Zytologische Befunde des vorliegenden Präparate-Kollektivs (n=76). Absoluter Zahlenwert; Prozentwert

3.3 Auswertung hinsichtlich Evidenzlevel

Die Auswertung der Patientendaten nach Evidenzlevel wird in Tabelle 10 verdeutlicht. Ein Großteil der *Follow-Up*-Daten konnte den jeweils höchsten Kategorien zugeordnet werden.

Bei den „positiven“ Diagnosen wird dies besonders deutlich, hier konnten 93,5% in die beiden höchsten Evidenzlevel (5 und 6) eingeteilt werden.

Die Verteilung bei den „negativen“ Ergebnissen stellt sich auf Grund der Unterteilung in 4 Level etwas abweichend dar, aber auch in dieser Gruppe konnten 64,3% dem höchsten Level (4) zugeordnet werden. Die Ergebnisse verdeutlichen sowohl in der Gruppe der „positiven“ Diagnosen als auch in der Gruppe der „negativen“ Diagnosen eine hohe Wertigkeit des durchgeführten *Follow-Ups*.

Tabelle 10: Aufteilung der *Follow-Up*-Daten von Wertungskategorie 1 nach Evidenzlevel.

Evidenzlevel	Anzahl (n) "positive" Diagnosen	Anzahl (n) "negative" Diagnosen
EL 1	0	0
EL 2	2	1
EL 3	2	4
EL 4	0	9
EL 5	56	-
EL 6	2	-
Insgesamt	62	14

EL: Evidenzlevel

3.4 Ergussätiologie

Die Ergüsse werden hinsichtlich ihrer Ätiologie in zwei grundlegende Gruppen unterteilt. Bei einer Gesamtzahl von $n=76$ gibt es zum einen die benignen Ergüsse ($n=14$) und zum anderen die malignen Ergüsse ($n=62$) Ergüsse. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, sind die malignen Ergüsse mit einem Prozentsatz von 82% weitaus häufiger als die Benignen. In diesem Kapitel wird auf die unterschiedlichen Ursachen innerhalb der Gruppen sowie auf geschlechterspezifische Unterschiede eingegangen.

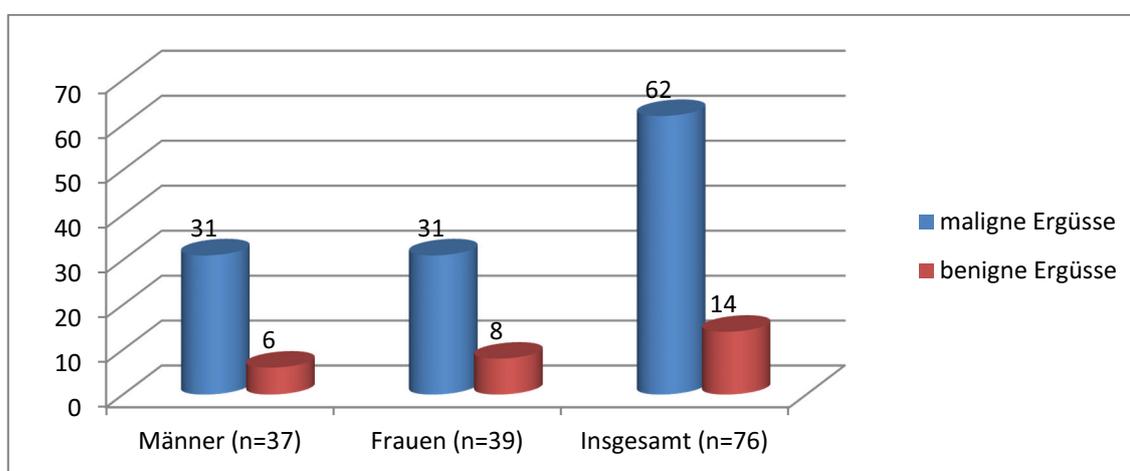


Abb. 16: Geschlechterspezifischer Unterschied benigner und maligner Ergüsse.

Betrachtet man den geschlechterspezifischen Unterschied, so zeigt sich, dass im Kollektiv der Männer die ausgewerteten Ergüsse zu 19% ($n=6$) benigner Natur waren. Im Kollektiv der Frauen handelte es sich bei 26% ($n=8$) um benigne Ergüsse.

3.4.1 Benigne Ergüsse

Betrachtet man die geschlechterspezifische Aufteilung nach Ursachen der „negativen“ Ergüsse, wie in Abbildung 17 dargestellt, so zeigt sich, dass bei den Frauen keine systemischen und stauungsbedingten Ergüsse auftraten, lediglich idiopathische und entzündliche Ergüsse wurden zu gleichen Teilen verzeichnet. Im Kollektiv der Männer sind alle vier Ursachen eines „tumorzell-negativen Ergusses“ vertreten, wobei hier die idiopathischen und systemischen Ursachen an erster Stelle stehen.

Dabei muss bedacht werden, dass die dargestellten Fälle diejenigen sind, bei denen sich ein Tumorverdacht immunzytochemisch nicht bestätigte, so dass die Verteilung der Ergussursachen nicht repräsentativ für das Gesamtkrankengut ist (vgl. Dannenberg (2015)).

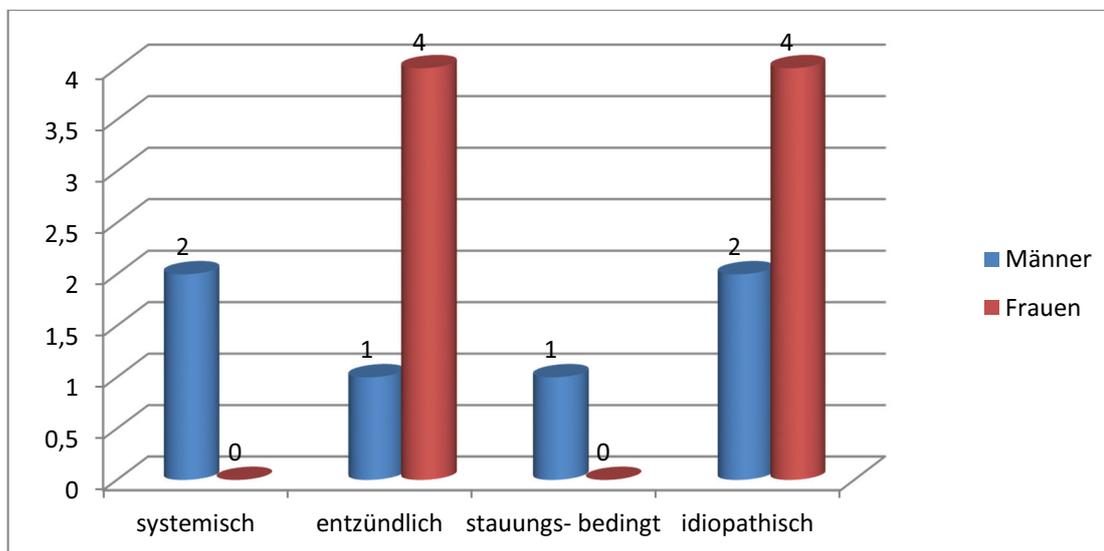


Abb. 17: Geschlechtsspezifische Verteilung der Ätiologie benigner Perikardergüsse.

Es ist festzustellen, dass 57% (n=8) der „tumorzell-negativen“ Ergüsse bei Frauen und 43% (n=6) bei Männern auftraten (vgl. Abb. 17). Die statistische Verteilung stellt sich wie in Tabelle 11 ersichtlich dar: bei den Frauen zeigt sich eine gleichmäßige Aufteilung zu je 50% zwischen entzündlichen und idiopathischen Ergüssen. Bei den Männern ist die Aufteilung breiter gefächert: Je 33,3% der Ergüsse waren systemsicher oder idiopathischer Natur, je 16,7% waren entzündlich oder stauungsbedingt.

Tabelle 11: Statistische Verteilung der „tumorzell-negativen“ Perikardergüsse nach Ätiologie bei Männern und Frauen.

Ätiologie	Männer (M)	Frauen (F)	Anteil (M) in %	Anteil (F) in %	Insgesamt (M+F)
Entzündlich	1	4	16,7%	50%	5
Idiopathisch	2	4	33,3%	50%	6
Systemisch	2	0	33,3%	0%	2
Stauung	1	0	16,7%	0%	1
Insgesamt	6	8	100,0%	100,0%	14

3.4.2 Maligne Ergüsse

Wie aus Abbildung 18 ersichtlich, liegt innerhalb der Kohorte der 62 „tumorzell-positiven“ Ergüssen eine gleichmäßige Verteilung zwischen Männern (50%) und Frauen (50%) vor.

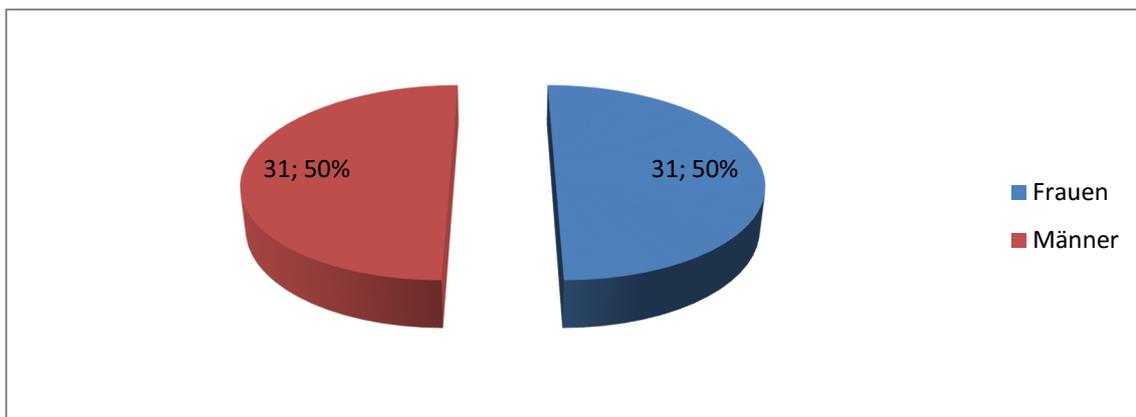


Abb. 18: Geschlechterverteilung der „tumorzell-positiven“ Ergüsse. Absoluter Zahlenwert; Prozentwert

Bezüglich der Primärtumoren zeigte sich, dass der größte Anteil der malignen Prozesse am Perikard bei beiden Geschlechtern bronchialen Ursprunges ist: 56,5% (n=35) aller „tumorzell-positiver“ Perikardergüsse gehen von einem Bronchialkarzinom aus. Weitere Primärtumore zeigten sich - wie in Abbildung 20 dargestellt - in der Häufigkeit ihres Auftretens geschlechtsübergreifend deutlich seltener. Betrachtet man die Herkunftsorgane geschlechtsspezifisch (s. Abb.19), so fällt auf, dass bei den Frauen Mammakarzinome mit 29% am zweithäufigsten den *Primarius* stellen. Bei den Männern liegen maligne Mesotheliome mit 9,7% mit deutlichem Abstand auf dem zweiten Platz der Herkunftsorgane.

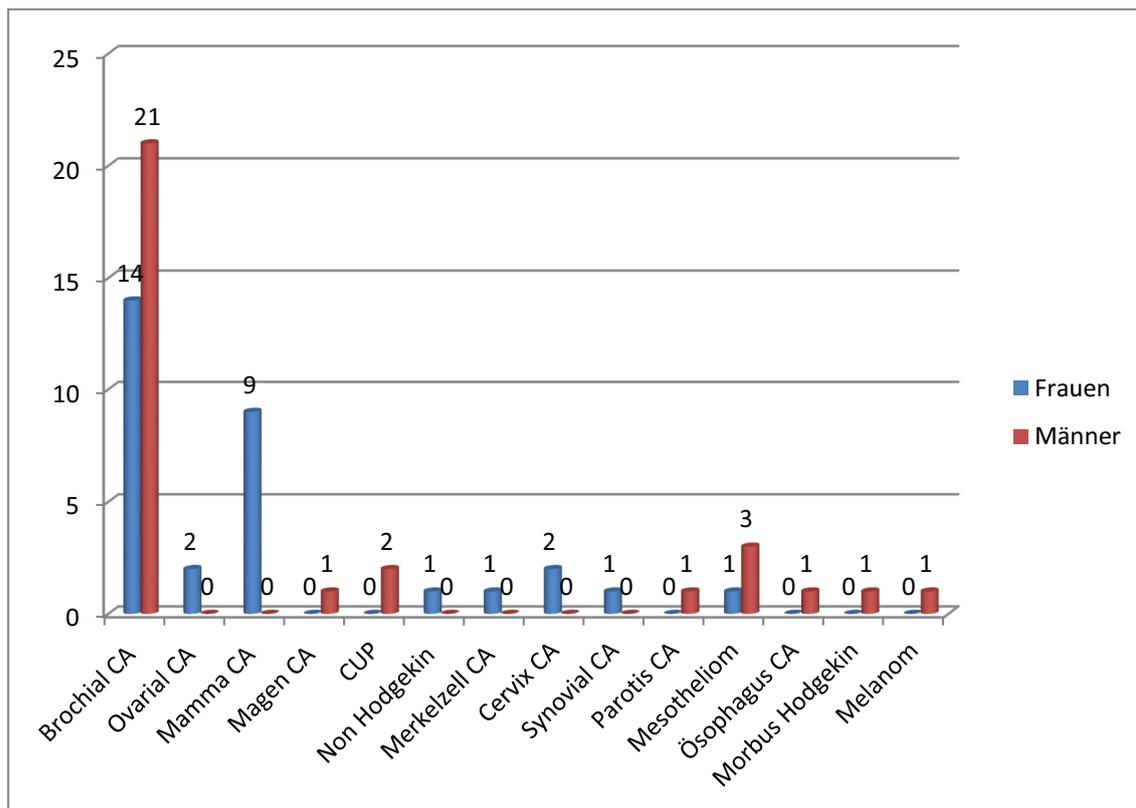


Abb. 19: Geschlechtsspezifische Verteilung nach Herkunftsorgan der „tumorzell-positiven“ Perikardergüsse.

In Tabelle 12 sind die vorkommenden Primärtumoren differenziert aufgeschlüsselt. Neben Bronchialkarzinomen, Mammakarzinomen und malignen Mesotheliomen kamen weitere Tumoren vor, darunter auch seltene wie ein Merkelzellkarzinom und ein Synovialkarzinom. Außerdem kamen auch Perikardabsiedlungen von Karzinomen des Ovars, der Cervix uteri, des Magens, des Ösophagus und der Glandula parotis sowie bei malignem Melanom vor. In zwei Fällen (= 3,2%) konnte die Tumorherkunft weder morphologisch, noch anhand der klinischen Verläufe geklärt werden, so dass abschließend die Diagnose eines CUP-Syndroms („*Cancer of unknown primary*“) gestellt wurde. Des Weiteren traten das Ovar und der Cervix bei 3,2% als Herkunftsorgan auf. Gefolgt von Magen, Ösophagus, Melanomen und Parotis mit jeweils 1,6%.

Tabelle 12: Statistische Verteilung der „tumorzell-positiven“ Perikardergüsse nach Ätiologie bei Männern und Frauen.

Herkunftsorgan	Männer (M)	Frauen (F)	Anteil (M) in %	Anteil (F) in%	Insgesamt (M+F)
Lunge	21	14	67,7%	45,2%	35 (56,5%)
Mamma	-	9	-	29,0%	9 (14,5%)
malignes Mesotheliom	3	1	9,7%	3,2%	4 (6,5%)
Lymphom	1	1	3,2%	3,2%	2 (3,2%)
Ovar	-	2	-	6,5%	2 (3,2%)
CUP	2	0	6,5%	0%	2 (3,2%)
Ösophagus	1	0	3,2%	0%	1 (1,6%)
Magen	1	0	3,2%	0%	1 (1,6%)
Cervix	-	2	-	6,5%	2 (3,2%)
Merkelzellen	0	1	0,0%	3,2%	1 (1,6%)
Parotis	1	0	3,2%	0,0%	1 (1,6%)
malignes Melanom	1	0	3,2%	0,0%	1 (1,6%)
Synovialkarzinom	0	1	0,0%	3,2%	1 (1,6%)
Insgesamt	31	31	100%	100%	62

F: Frau; M. Mann; %: Prozent

3.4.3 Zusammenfassende Darstellung der häufigsten Ursachen beider Dignitäten

Bei Betrachtung der statistischen Verteilung aller Perikardergüsse nach Ätiologie bei Männern und Frauen (s. Tabelle 13), zeigt sich, dass mit 46,1% die häufigste Ursache für Perikardergüsse bei beiden Geschlechtern Lungenkarzinome sind. Bei Frauen folgen auf dem zweiten Platz mit 23,1% die Mammakarzinome, die auch bei der Gesamtbetrachtung einen Anteil von 11,8% ausmachen. Bei Männern sind maligne Mesotheliome mit 8,1% zweithäufigste Ursache für Perikardergüsse. In der Gesamtbetrachtung nehmen maligne Mesotheliome allerdings nur einen Anteil von 5,3% ein und liegen damit nur auf Platz sechs. In der Gesamtbetrachtung liegen hingegen benigne Ursachen auf Platz drei und vier der häufigsten Ursachen, gemeinsam nehmen systemische und idiopathische Ergüsse einen Anteil von 15,8% ein. Auch entzündliche Ergüsse erweisen sich mit 6,6% als häufiger ursächlich als maligne Mesotheliome. Eine genaue Darstellung über die statistische Verteilung sowohl benigner als auch maligner Perikardergüsse enthält die folgende Tabelle:

Tabelle 13: Statistische Verteilung der Perikardergüsse nach Ätiologie bei Männern und Frauen.

Ursache	Männer (M)	Frauen (F)	Anteil (M) in ≈ %	Anteil (F) in ≈ %	Insgesamt (M+F)
Maligne:					
Lungen CA	21	14	56,8%	35,9%	35 (≈46,1%)
Mamma CA	-	9	-	23,1%	9 (≈11,8%)
malignes Mesotheliom	3	1	8,1%	2,6%	4 (≈5,3%)
Lymphom	1	1	2,7%	2,6%	2 (≈2,6%)
OvarCA	-	2	-	5,1%	2 (≈2,6%)
CUP	2	0	5,4%	0%	2 (≈2,6%)
Ösophagus CA	1	0	2,7%	0%	1 (≈1,3%)
Magen CA	1	0	2,7%	0%	1 (≈1,3%)
Cervix CA	-	2	-	5,1%	2 (≈2,6%)
Merkelzell CA	0	1	0,0%	2,6%	1 (≈1,3%)
Parotis CA	1	0	2,7%	0,0%	1 (≈1,3%)
malignes Melanom	1	0	2,7%	0,0%	1 (≈1,3%)
Synovial CA	0	1	0,0%	2,6%	1 (≈1,3%)
Benigne:					
Idiopathisch	2	4	5,4%	10,2%	6 (≈7,9%)
Systemsich	2	0	5,4%	0%	6 (≈7,9%)
Stauungsbedingt	1	0	2,7%	0%	1 (≈1,3%)
Entzündlich	1	4	2,7%	10,2%	5 (≈6,6%)
Insgesamt	37	39			76

F: Frau; M. Mann; %: Prozent

3.5 Immunzytochemische Untersuchungen zum Tumornachweis

Bei der Subkohorte 1 bestehend aus 29 Proben, bei denen man Tumorzellen für möglich hielt, aber sie konventionell-zytologisch nicht beweisen konnte, wurde die Immunzytochemie zum Nachweis von Tumorzellen oder zu ihrem Ausschluss eingesetzt. In 29 Fällen wurde BerEP4 und bei 23 Fällen zusätzlich HEA-125 als diagnostische Marker eingesetzt, ferner wurde bei vier Fällen ergänzend auch Calretinin zur Detektion von mesothelialen Zellen angewandt. Auf diese Weise konnte im Zuge der vier Calretinin-Einsätze ein Mesotheliom nachgewiesen und zwei Verdachtsfälle entkräftet werden. In einem Fall wurde Pan-Cytokeratin eingesetzt. Die

Anwendung von CD20, CD45 und CD45Ro in zwei Fällen diente jeweils dem Ausschluss von malignen Lymphomen. Die Marker-Verteilung ist in Tabelle 14 ersichtlich.

Tabelle 14: Markeranwendung in der Subkohorte1.

Marker	Anzahl der Fälle
Ber Ep4	29
HEA 125	23
Calretinin	4
Pan-Cytokeratin	1
CD 20	2
CD 45	2
CD 45 Ro	2

Vor der detaillierten Ausarbeitung der Daten in den Subkapiteln 3.5.1 und 3.5.2 sollen die Ergebnisse folgend kurz tabellarisch vorgestellt werden (vgl. Tabelle 15).

Tabelle 15: Datenverteilung von zytologischen Befunden und immunzytochemischen Anwendungen zum Tumorzellnachweis (Subkohorte 1, n = 29).

Zytologischer Befund	Immunzytochemischer Befund			Summe
	positiv	dringender Verdacht	negativ	
positiv	3	1	0	4
dringender Verdacht	3	0	2	5
zweifelhaft	8	2	9	19
negativ	1	0	0	1
Summe	15	3	11	29

3.5.1 Berechnung der Treffsicherheit nach Wertungskategorie 1

In der Wertungskategorie 1 (vgl. Kapitel 2.3.2.) werden die „tumorzell-positiven“ (n=4) und die „dringend verdächtigen“ Fälle (n=5) nach konventioneller Zytologie als positiv gewertet, die „tumorzell-negativen“ (n=1) und „zweifelhaften“ Fälle (n=19) als negativ. Die Treffsicherheit der konventionell-zytologischen Untersuchung für die 29 Fälle ist in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Verteilung der absoluten Häufigkeiten der konventionell-zytologischen Untersuchungen zum Tumornachweis in Wertungskategorie 1.

	Diagnostik +	Diagnostik -	Summe
Tumor +	7	9	16
Tumor -	2	11	13
Summe	9	20	29

Diagnostik +/-: Diagnose maligne/benigne; Tumor +/-: Tumor maligne/benigne.

Bei Betrachtung der konservativ-zytologischen Untersuchungen (s. Tabelle 16) zeigt sich, bei nur 7 „richtig-positiven“ Diagnosen gegenüber 16 tatsächlich malignen Ergüssen, eine Sensitivität von 43,8%. Die Spezifität als Quotient der „richtig-negativen“ Fälle (n=11) und der Gesamtzahl aller tatsächlich „negativen“ Fälle (n=13) einen Wert von 84,6%. Daraus resultieren eine Falsch-Negativ-Rate von 56,3% und eine Falsch-Positiv-Rate von 15,4%. Der positive Prädiktionswert erreicht Wert von 77,8%. Der negative Prädiktionswert erreicht einen Wert von 55%. Die Gesamttreffer sicherheit ergibt sich aus dem Vergleich der korrekt gestellten Diagnosen (n=18) mit der Gesamtfallzahl (n=29) und beträgt 62,1%.

Nach Anwendung der Immunzytochemie (vgl. Tabelle 17) konnten 14 „richtig-positiv“ Diagnosen gegenüber der Gesamtzahl aller tatsächlich positiven Tumorfälle (n=16) gestellt werden, woraus eine Sensitivität von 87,5% resultiert. Die Spezifität hat als Quotient der immunzytochemisch „richtig-negativen“ Fälle (n=9) und der Gesamtzahl aller tatsächlich „negativen“ Fälle (n=13) einen Wert von 69,2%. Dies ergibt eine Falsch-Negativ-Rate von 12,5% und eine Falsch-Positiv-Rate von 30,8%. Der positive Prädiktionswert erreicht einen Wert von 77,8%. Der negative Prädiktionswert erreichte einen Wert von 81,8%. Die Gesamttreffer sicherheit ergibt sich aus dem Vergleich der korrekt gestellten Diagnosen (n=23) mit der Gesamtfallzahl (n=29) und beträgt 79,3%.

Tabelle 17: Verteilung der absoluten Häufigkeiten immunzytochemischer Untersuchungen zum Tumornachweis in Wertungskategorie 1.

	Diagnostik +	Diagnostik -	Summe
Tumor +	14	2	16
Tumor -	4	9	13
Summe	18	11	29

Diagnostik +/-: Diagnose maligne/benigne; Tumor +/-: Tumor maligne/benigne.

Die genannten Werte sind in Tabelle 18 noch einmal zusammengefasst.

Der Zahlenvergleich zeigt, dass sich durch den Einsatz adjuvanter Diagnostik eine deutliche Verbesserung der Sensitivität von 43,8% auf 87,5% ergibt. Ebenso hat sich die Falsch-Negativ-Rate mehr als geviertelt und sich von 56,3% auf 12,5% reduziert. Im Gegensatz zu den soeben genannten Entwicklungen liegt bei der Falsch-Positiv-Rate eine Verdopplung von 15,4% auf 30,8% vor. Die Gesamttreffer-sicherheit verbesserte sich jedoch von 62,1% auf 79,3%.

Tabelle 18: Gegenüberstellung der Treffsicherheit von zytologischer Diagnostik ohne adjuvante Methoden und mit adjuvanter Methoden an Perikardergüssen in Wertungskategorie 1 (n=29).

Statistische Kennzahlen	Konventionelle Zytologie zum Tumornachweis in Wertungskategorie 1	Immunzytochemische Diagnostik zum Tumornachweis in Wertungskategorie 1
Sensitivität	43,8%	87,5%
Spezifität	84,6%	69,2%
„Falsch-Positiv-Rate“	15,4%	30,8%
„Falsch-Negativ-Rate“	56,3%	12,5%
„positive Prädiktionswert“	77,8%	77,8%
„negative Prädiktionswert“	55%	81,8%
Gesamttreff-sicherheit	62,1%	79,3%

Im Folgenden soll besonders auf die 19 Fälle eingegangen werden, die konventionell-zytologisch als „zweifelhaft“ eingeordnet worden waren, da eines der Ziele einer verbesserten Diagnostik sein muss, eine hohe Aufklärungsrate besonders in diesem Kollektiv herbeizuführen. Insgesamt konnte die weiterführende immunzytochemische Diagnostik mit Markern wie BerEP4 und HEA 125 eine hohe Aufklärungsrate herbeiführen: von den 19 Fällen erwiesen sich im *Follow-Up* 10 als tatsächlich „negativ“, 9 Fälle als „positiv“. Von den 9 malignen Ergüssen wurden durch immunzytochemische Marker 8 Proben als „positiv“ erkannt (Tabelle 19). Insgesamt ergab sich daraus für die adjuvante Diagnostik eine Sensitivität von 88,9% und Spezifität von 80%. Die Gesamttrefferquote beläuft sich auf 84,2 %.

Tabelle 19: Verteilung der absoluten Häufigkeiten immunzytochemischer Untersuchungen an zytologisch „zweifelhaften“ Fällen in Wertungskategorie 1.

	Diagnostik +	Diagnostik -	Summe
Tumor +	8	1	9
Tumor -	2	8	10
Summe	10	9	19

Diagnostik +/-: Diagnose maligne/benigne; Tumor +/-: Tumor maligne/benigne.

3.5.2 Berechnung der Treffsicherheit nach Wertungskategorie 2

Die Wertungskategorie 2 definiert sich - wie bereits beschrieben - dadurch, dass die „tumorzell-positiven“, „dringend verdächtigen“ sowie die „zweifelhaften“ Fälle als „positiv“ betrachtet werden. Demnach werden hier nur die „tumorzell-negativen“ Fälle als „negativ“ angesehen.

Betroffen von dieser Änderung der Zuordnung der „zweifelhaften“ Fälle ist die konventionelle Zytologie. Sie unterliegt einer Veränderung, weil durch die Zytologie 19 Proben als „zweifelhaft“ eingestuft wurden und nunmehr statt negativ als positiv gewertet werden. Tabelle 20 zeigt auf der Grundlage einer Vierfeldertafel die

statistische Auswertung der Treffsicherheit der konventionellen Zytologie hinsichtlich der Wertungskategorie 2.

Tabelle 20: Verteilung der Häufigkeiten der konventionell-zytologischen Untersuchungen zum Tumornachweis in Wertungskategorie 2.

	Diagnostik +	Diagnostik -	Summe
Tumor +	16	0	16
Tumor -	12	1	13
Summe	28	1	29

Diagnostik +/-: Diagnose maligne/benigne; Tumor +/-: Tumor maligne/benigne.

Betrachtet man die Sensitivität der konventionellen Zytologie aus dem neuen Blickwinkel, so stellt sich bei 16 „richtig-positiven“ Diagnosen gegenüber der Summe aller tatsächlich „positiven“ Tumorfälle (n=16) eine Sensitivität von 100% heraus.

Die Spezifität erreichte als Quotient der „richtig-negativen“ Fälle (n=1) und der Summe aller tatsächlich „negativen“ Fälle (n=13) einen Wert von 7,7%.

Bei Betrachtung der Gesamttreffsicherheit ergab sich aus dem Vergleich aller zytologisch richtig gestellten Diagnosen (n=17) mit der Gesamtstudienfallzahl (n=29), eine Gesamttreffsicherheit von 58,6%.

Vergleicht man die statistischen Kennzahlen der Zytologie mit und ohne Anwendung der immunzytochemischen Untersuchungen (s. Tabelle 21), so lässt sich ein deutlicher Zuwachs der Sensitivität auf Seiten der nicht-adjuvanten Diagnostik aufgrund der veränderten Kategorisierung als Wertungskategorie 2 erkennen, allerdings auf Kosten der Spezifität, die dann nur noch bei 7,7% liegt. Auf Seiten der adjuvanten Diagnostik hat keine Veränderung gegenüber der Wertungskategorie 1 stattgefunden, weil keine „zweifelhaften“ Fälle der Immunzytochemie vorlagen. Die Gesamttreffsicherheit ist auch bei dieser neuen Betrachtungsweise der Wertungskategorie 2 ein stabil vergleichbarer Wert, der den Nutzen adjuvanter Diagnostik unterstreicht: die

Gesamttreffsicherheit der adjuvanten Diagnostik ist mit 79,3% über 20 Prozentpunkte höher als die Gesamttreffsicherheit ohne adjuvanten Diagnostik (s. Tabelle 21).

Tabelle 21: Gegenüberstellung der Treffsicherheit von zytologischer Diagnostik ohne adjuvante Methoden und mit adjuvanten Methoden an Perikardergüssen in Wertungskategorie 2 (n=29).

Statistische Kennzahlen	Konventionelle Zytologie zum Tumornachweis in Wertungskategorie 2	Immunzytochemische Diagnostik zum Tumornachweis in Wertungskategorie 2
Sensitivität	100%	87,5 %
Spezifität	7,7 %	69,2 %
Gesamttreffsicherheit	58,6 %	79,3%

3.5.3 Nachträglich durchgeführte Untersuchungen der Subkohorte 1

In der Subkohorte 1 wurden in Rahmen der Studie bei zwei Patienten nachträgliche Untersuchungen vorgenommen, nachdem die zur originalen Diagnostik durchgeführten immunzytochemischen Färbungen zum Teil zum klinischen Verlauf diskrepante Ergebnisse erbracht hatten.

Fall 1

Bei einem 23-jährigen Patienten wurden während eines Zeitraums von 16 Monaten insgesamt sechs Perikardergüsse punktiert und untersucht (s. Tabelle **22**). Die Punktate 1, 2, 4 und 5 sind „negativ“ beurteilt worden, das Punktat 3 hingegen als „zweifelhaft“. Immunzytochemisch erwies es sich zum Zeitpunkt der originären Diagnostik als BerEP4- und HEA125-„negativ“ und wurde daher als „negativ“ klassifiziert. Zwischenzeitlich wurde bei dem Patienten ein myoepitheliales Parotiskarzinom diagnostiziert. Das sechste und letzte Punktat wurde zum Zeitpunkt der Erkrankung lediglich zytologisch untersucht und ergab ein „positives“ Ergebnis, das als gut vereinbar mit einer Perikardbeteiligung bei einem metastasierenden nicht kleinzelligen Karzinom bzw. auch mit dem klinisch bekannten myoepithelialen Parotiskarzinom interpretiert wurde.

Im Rahmen dieser Studie wurde zum einen die dritte Probe erneut begutachtet, um einen „*Screening Error*“ auszuschließen oder zu beweisen. Dabei bestätigte sich, dass es sich um einen hämorrhagischen und abschließend als „negativ“ zu klassifizierenden Erguss handelte (s. Abb. 20).

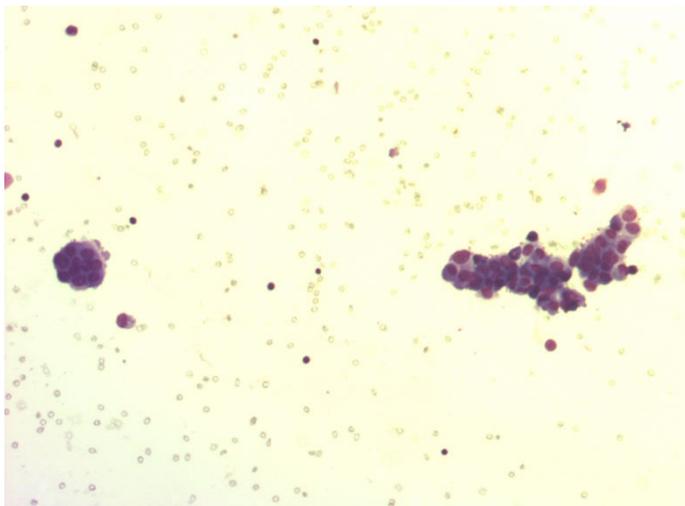


Abb. 20: Nachbetrachtung von Probe 3, hämorrhagischer Erguss, MGG-Färbung, 400-fach vergrößert.

Zum anderen wurde die sechste Probe, die zum Zeitpunkt der Erkrankung nur zytologisch untersucht worden war, mit den immunzytochemischen Markern BerEP4 und HEA 125 weiter untersucht, wobei sich beide Marker als eindeutig „positiv“ darstellten, angefärbt (s. Abb. 21).

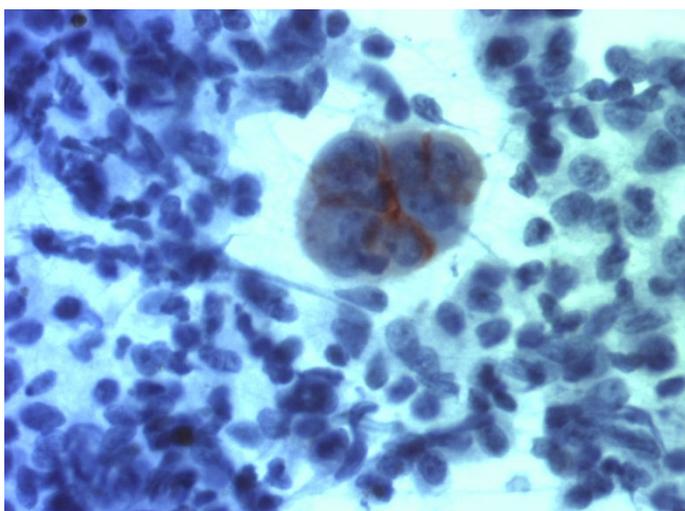


Abb. 21: Immunzytochemische Nachuntersuchung von Probe 6, BerEP4 „positiv“, Papanicolaou-Färbung, 400-fach vergrößert.

Die Fotos sind exklusiv für die vorliegende Studie am Institut für Pathologie entstanden.

Abschließend stellten sich somit die beiden Diagnosen an den Punktaten 3 und 6 als jeweils richtig heraus. In folgender Tabelle sind die originale und die nachträgliche Diagnostik chronologisch aufgeführt.

Tabelle 22: Darstellung der nachträglichen Untersuchungen des 1. Patientenfalls.

Probe	Untersuchungsdatum	Erguss ml	Zytologie	Immunzytochemie	Marker
Probe 1	23.08.2010	1300	negativ	x	
Probe 2	25.08.2010	200	negativ	x	
Probe 3	09.09.2010	50	zweifelhaft	x	
Immunzytologie Probe3	16.09.2010	50	x	negativ	Ber-EP4, HEA125
Immunzytochemische Nachuntersuchung	20.12.2012	50	x	negativ	Ber-EP4, HEA125
Probe 4	09.09.2010	300	negativ	x	
Probe 5	13.09.2010	400	negativ	x	
Probe 6	15.02.2011	85	Positiv, nicht-kleinzelliges Karzinom	x	
Immunzytochemische Nachuntersuchung	20.12.2012		x	positiv	Ber-EP4, HEA125

Fazit der nachträglichen Untersuchungen ist, dass es sich bei der immunzytochemischen Untersuchung der dritten Probe, welche zum Zeitpunkt der Erkrankung maßgeblich zu der Diagnose eines „negativen“ Ergusses führte, nicht um einen „*Screening-Error*“ handelte. Denkbar ist hingegen, dass die Ergussprobe vom 16.09.2010 tatsächlich keine Tumorzellen enthielt oder, dass es sich um einen „*Sampling-Error*“ handelte. Die Nachuntersuchung der sechsten Probe sollte zeigen, ob eine Immunzytochemie die „positive“ Diagnose der Zytologie bestätigen konnte.

Fall 2

Bei einem 74-jährigen Patienten wurde ein 7,5 ml umfassender, hell-gelber und leicht trüber Perikarderguss untersucht. Zytologisch wurde die Probe als „dringend verdächtig“ eingestuft. Zur weiteren Abklärung wurde eine weiterführende Immunzytochemie mit den Markern BerEP4 und HEA 125 durchgeführt und für beide Marker als positiv interpretiert, so dass eine Perikardbeteiligung eines metastasierenden nicht kleinzelligen Karzinoms diagnostiziert wurde. Im *Follow-Up* stellte sich jedoch heraus, dass der Perikarderguss bei generalisierter Arteriitis temporalis (Morbus Horton) entzündlicher Genese war. Zur weiteren Diagnose-sicherung wurde auch eine Echokardiografie durchgeführt. Nach hochdosierter Kortison-Therapie kam es zu keinen weiteren Rezidiven.

Im Zuge der Studie wurden die immunzytochemischen Präparate der Probe noch einmal kontrolliert und die Färbesignale an auffälligen Zellen als zwar in gewisser Weise spezifisch, aber doch eher schwach angesehen. Da die Zellen zum Teil auch in eher unverdächtigen Verbänden lagen, wurde ergänzend zur Klärung der Frage, ob es sich nicht doch um reaktive Mesothelien handeln könnte, noch eine Calretinin-Immunzytochemie angeschlossen, die deutlich positiv war. In Tabelle 23 sind die diagnostischen Abläufe noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 23: Darstellung der nachträglichen Untersuchungen des 2. Patientenfalls.

Probe	Unter-suchungs-datum	Erguss in ml	Zytologie	Immun-zytochemie	Marker
Probe 1	15.02.2005	7,5	„dringender Verdacht“	x	
Immun-zytologie Probe 1	17.02.2005	7,5	x	„positiv“, nicht kleinzelliges Karzinom	Ber-EP4, HEA125
Immunzyto-chemische Nach-untersuchung	20.12.2012			negativ	Ber-EP4, HEA125, Calretinin

Fazit der nachträglichen Untersuchung ist die Revision der Diagnose, die als „falsch positiv“ klassifiziert werden musste. Es lag somit ein „*Screening Error*“ in dem Sinne vor, dass eine schwache Immunreaktion nicht kritisch hinterfragt worden ist, sondern

als positiv interpretiert worden ist. Im Nachhinein weist die starke Positivität für den mesothelialen Marker Calretinin in Richtung reaktiver Mesothelien hin. Die falsche Zuordnung ereignete sich im Winter 2005, also noch in einer Art Lernphase bei der Interpretation der Immunzytochemie.

Die zum *Follow-Up* zur Verfügung stehenden Erkenntnisse entsprechen einem Evidenzlevel 4: zur weiteren Diagnosesicherung wurde seitens des Kliniklers eine Echokardiografie durchgeführt, die negativ ausfiel. Ein CT oder eine Histologie sind nicht erfolgt. Für Benignität spricht außerdem, dass sich nach Punktion und hochdosierter Kortison Therapie eine Rückbildung des Ergusses zeigte; außerdem kam es zu keinen weiteren Rezidiven im folgenden Jahr. Die abschließende Diagnose des Kliniklers lautete auf Perikardergussbildung im Rahmen einer Arteriitis temporalis (Morbus Horton).

3.6 Immunzytochemische Untersuchung zur Tumortypisierung

In der Subkohorte 2 (n=47) wurden an Fällen, an denen zuvor konventionell-zytologisch eine Tumordiagnose bereits gestellt werden konnte, immunzytochemische Untersuchungen zur Tumortypisierung eingesetzt. Hierzu wurden die in Kapitel 2.2.7 beschriebenen Marker verwendet.

In allen 47 Fällen war aus technischer Sicht eine Auswertung der Immunzytochemie möglich. In 42 Fällen (89%) gelang eine korrekte immunzytochemische Zuordnung der Perikardkarzinose zum Primärtumor, in fünf Fällen gelang dies nicht (11%) (s. Abb. 22).

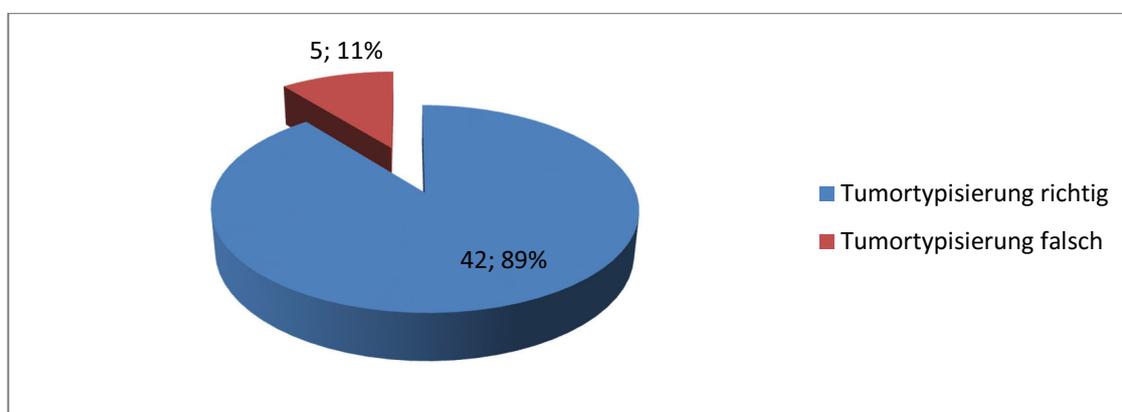


Abb. 22: Darstellung der Treffsicherheit der Tumortypisierung in Subkohorte 2 (n=47). Absoluter Zahlenwert; Prozentwert.

In Tabelle 24 sind die Ergebnisse der Immunzytochemie in Korrelation zum zugrunde liegenden Primärtumor aufgeführt.

Tabelle 24: Immunzytochemische Korrelation zum zugrunde liegenden *Primarius*.

Malignom	richtige Typisierungen/ Zahl der Karzinome	%	Immunzytochemische Diagnose der diskrepanten Fälle
Lungenkarzinom	29/30	96,7	Vermutlich Magen-/ Pankreaskarzinom (n=1)
Mammakarzinom	3/3	100	
Ovarialkarzinom	2/2	100	
Cervixkarzinom	0/1	0	Vermutlich Mammakarzinom (n=1)
Mesotheliom	3/3	100	
Non Hodgkin Lymphom	1/1	100	
Hodgkin Lymphom	0/1	0	Perikarderguss mit ausgeprägter lymphatischer Infiltration (n=1)
Merkelzellkarzinom	1/1	100	
Melanom	0/1	0	Hämorrhagischer Erguss mit aktivierten Mesothelien (n=1)
Synovialkarzinom	1/1	100	
Ösophaguskarzinom	0/1	0	Verdacht auf Bronchialkarzinom bei geringer immunzytochemischer Reaktivität (n=1)
CUP	1/1	100	
Benigne	1/1	100	Diese Typisierung diente dem Ausschluss einer Perikardbeteiligung bei Verdacht auf Non Hodgkin Lymphom

CUP: Cancer of unknown primary

Die einzige häufige Tumorentität innerhalb dieser Subkohorte war das Lungenkarzinom (n=30), das in 96,7% der Fälle richtig typisiert werden konnte; insgesamt wurden 89,4% aller Tumoren korrekt zugeordnet (42/47). Bei Mammakarzinomen (n=3), Ovarialkarzinomen (n=2) und Mesotheliomen (n=3) konnte zu 100% eine richtige Typisierung erfolgen. In den fünf Fällen, bei denen die Typisierung nicht

gelang, stellten sich die tatsächlichen Diagnosen und das Färbe-ergebnis wie in Tabelle 25 ersichtlich dar.

Tabelle 25: Darstellung der tatsächlichen Diagnose und des Färbeergebnisses im Kollektiv der falschen Typisierungen.

Malignom (Anzahl)	Fälschliche Typisierung	Immunreaktivität Marker: Score
Bronchialkarzinom (1)	Vermutlich Magen-/ Pankreaskarzinom (1)	CK5/6: 5, CK7: 5, CK20: 5, CDX2: 0, TTF1: 0
Cervixkarzinom (1)	Vermutlich Mammakarzinom(1)	CK 5/6:4, CK7:5, CK20: 0, CA125:0, Mammaglobin: 1, CDX2: 1, TTF1: 0
Melanom (1)	Hämorrhagischer Erguss mit aktivierten Mesothelien (1)	HMB 45: 0, Melan A: 0, Calretinin: 1
Ösophaguskarzinom (1)	Bronchialkarzinom (1) Geringe immunzyto- chemische Reaktivität	CK5/6: 1, CK7: 2, CK20: 1, CDX2: 0, TTF1: 0
Morbus Hodgkin (1)	Perikarderguss mit ausgeprägter lymphatischer Infiltration (1)	CD 20: 2% der lymphatischen. Zellpopulation positiv; Cd Ro 45: 98% der lymphatischen Zellpopulation positiv

Betrachtet man diese Fälle nun differenzierter, so ist ersichtlich, dass im Falle des nicht erkannten Ösophaguskarzinoms die immunzytochemische Reaktivität gering ausgefallen war, somit die Beurteilbarkeit eingeschränkt war. Im Falle des nicht erkannten Melanoms konnte durch eine nachträgliche Beurteilung ein „*Screening-Error*“ ausgeschlossen werden, bei den drei verbleibenden Fällen konnte im Nachhinein nicht evaluiert werden, ob es sich um ein „*Screening-Error*“ oder „*Sampling-Error*“ handelt. Jedoch ist festzuhalten, dass im Vergleich zur originalen Diagnostik in allen 3 Fällen eine vermutliche Diagnose hinsichtlich des *Primarius* gestellt wurde.

3.6.1 Markerspezifische Betrachtung der Subkohorte 2

Die markerspezifische Betrachtung (s. Tabelle 26) der drei häufigsten *Primarii* eines malignen Perikardergusses umfasst zum einen die qualitative Auswertung der Fälle mit positiver Immunreaktion angegeben in Prozent. Diese errechnet sich aus der Summe der markerpositiven Fälle dividiert durch die Anzahl der getesteten Fälle, hierbei ist zu beachten, dass nicht alle Marker bei allen Fällen angewendet wurden. Zum anderen

wurde bei positiver Immunreaktion, die quantitative Parameterauswertung, der *Score* berechnet. Der *Score* definiert sich wie folgt: Anzahl der angefärbten Tumorzellen dividiert durch die Gesamttumorzellzahl. Dabei handelt es sich um die Darstellung des arithmetischen Mittels; zu dessen Berechnung wurden also lediglich die Fälle mit positiver Immunreaktion berücksichtigt (*Score* > 0). Auf diese Weise wurde verhindert, dass durch die ungefärbten Präparate eine statistische Verzerrung des Durchschnitts*scores* entsteht.

Tabelle 26: Anzahl der Fälle mit positiver Immunreaktion und dem arithmetischen *Score* für die am häufigsten angewandten Marker bezogen auf die 3 häufigsten *Primarii* der Subkohorte 2 (n=47).

Mamma (n=3)						
Marker	CK 5/6	CK 7	CK 20	CDX 2	CA 125	TTF 1
Anzahl der Fälle mit positiver Immunreaktion in %	100	100	66,6	0	100	0
<i>Score</i> im arithmetischen Mittel	3,5	5	2	0	4,5	0
Ovar (n=2)						
Marker	CK 5/6	CK 7	CK 20	CDX 2	CA 125	TTF 1
Anzahl der Fälle mit positiver Immunreaktion in %	50	100	0	0	100	0
<i>Score</i> im arithmetischen Mittel	1	4	0	0	5	0
Lunge n=(30)						
Marker	CK 5/6	CK 7	CK 20	CDX 2	CA 125	TTF 1
Anzahl der Fälle mit positiver Immunreaktion in %	88,5	100	69,2	7,7	100	58,6
<i>Score</i> im arithmetischen Mittel	3,2	4,6	2,6	1	3,33	3,4

Bei Betrachtung der immunzytochemischen Ergebnisse der Marker CK5/6, CK7 und CK20 fällt auf, dass bezogen auf die drei dargestellten *Primarii* sich keine organspezifische Anfärbetendenz abzeichnet. Bei den drei dargestellten Organtumoren kommt es zu einer Anfärbung mit CK5/6, die Anfärbeprevalenz schwankt zwischen 50% (Ovar), 100% (Mamma) und 88,5% (Lunge), wobei der Anteil gefärbter Zellen breitgefächert zwischen *Score* 1 bis 3,5 verteilt ist. Sowohl bei Mammakarzinomen und Ovarialkarzinomen als auch bei Bronchialkarzinomen zeigt sich für CK7 in 100% der Fälle eine positive Immunreaktion, der arithmetische *Score* schwankt zwischen 4 (Ovar) und 5 (Mamma). Für CK20 zeigt sich eine bei Mamma-karzinomen in 66,6% und bei Bronchialkarzinomen in 69,2% der Fälle eine positive Immunreaktion, wobei die

Anzahl der gefärbten Zellen in einem quantitativ niedrigen Bereich von *Score* 2 (Mamma) bis 2,6 (Lunge) liegen.

Bei Untersuchung des Markers CA125 zeigt sich, dass hier im Vergleich zu anderen Studien bei zwei von zwei getesteten Mammakarzinomen eine positive Immunreaktion mit einem durchschnittlichen *Score* von 4,5 stattfand. Außerdem konnte bei 100% der Ovarialkarzinome eine positive Immunreaktion mit einem durchschnittlichen *Score* von 5 gezeigt werden.

Angesichts des Markerverhaltens von CDX2 fällt auf, dass lediglich 7,7% der Lungenkarzinome mit einem arithmetischen *Score* von 1 angefärbt wurden. Dies ist ein zu erwartendes Ergebnis, da CDX2 ein spezifischer Marker für Kolon- und Pankreaskarzinome ist.

TTF1 zeigt in 58,6% der getesteten Lungenkarzinome eine Anfärbung, der durchschnittliche *Score* liegt bei 3,4 (Tabelle 26).

Die isolierte Darstellung der positiven Marker führt zu der Quintessenz, dass die Einzelbetrachtung häufig keine genügende und verbindliche Aussagekraft besitzt. Hingegen ermöglicht die Gesamtbetrachtung der Markerkonstellation analog zum in Kapitel 2.2.7 vorgestellten Algorithmus eine zielführende Diagnostik (Pomjanski et al., 2005).

3.6.2 Nachträglich durchgeführte Untersuchungen der Subkohorte 2

In der Subkohorte 2 wurde in Rahmen der Studie bei einem Patienten eine nachträgliche Betrachtung der Präparate vorgenommen, nachdem die zur originalen Diagnostik durchgeführte immunzytochemische Färbung zum klinischen Verlauf diskrepante Ergebnisse erbracht hatte.

Fall 1

Bei einem 49 Jahre alten Patienten mit klinisch bekannten metastasierenden Melanom (Lymphknotenmetastasen retroklavikulär) wurde ein 40 ml umfassender, gelblich-trüber Perikarderguss untersucht. Zytologisch wurde die Probe als „zweifelhaft“ eingestuft. Zur weiteren Abklärung wurde eine weiterführende Immunzytochemie mit

den Markern HMB45, Melan A und Calretinin durchgeführt und für die Marker HMB45 und Melan A als negativ jedoch für Calretinin als „verdächtige Zellen positiv“ interpretiert, so dass eine Perikardbeteiligung eines metastasierenden Melanoms ausgeschlossen und der Erguss als hämorrhagisch mit aktivierten Mesothelien eingestuft wurde. Im *Follow-Up* stellte sich heraus, dass der Patient an den Folgen eines metastasierenden Melanoms verstorben ist. Im Zuge der Studie wurden die immunzytochemischen Präparate noch einmal beurteilt und die Färbesignale der Marker HMB45 und Melan A erneut als unauffällig angesehen. Zudem lagen die Zellen auch in eher unverdächtigen Verbänden.

Fazit der nachträglichen Begutachtung ist, dass es sich bei der immunzytochemischen Untersuchung nicht um einen „*Screening-Error*“ handelte. Denkbar ist hingegen, dass der untersuchte Erguss - trotz klinisch bekanntem metastasierenden Melanoms - tatsächlich keine Tumorzellen enthielt oder, dass es sich um einen „*Sampling-Error*“ handelte.

3.7 Immunzytochemische Untersuchungen zur Hormonrezeptoranalyse und zur Her-2/neu-Bestimmung

Insgesamt wurden an drei Fällen Her-2/neu-Bestimmungen und Hormonrezeptoranalysen zur Östrogen- bzw. Progesteronrezeptorexpression durchgeführt. Bei zwei Patientinnen lag ein bekanntes Mammakarzinom vor und es wurde lediglich eine therapierelevante Hormonrezeptoranalyse und Her-2/neu-Bestimmung durchgeführt. Bei einer Patientin der Kohorte wurde zeitlich parallel zu den drei Bestimmungen von ER, PR und Her-2/neu mit den Markern CK5/6, CK7, CK20, CA125, CDX2, TTF-1 und Mammaglobin die Brust als *Primarius* ausgeschlossen und die Lunge als Sitz des Primärtumors identifiziert.

Bei allen drei Patientinnen verliefen die Hormonrezeptoranalysen und die Her-2/neu-Bestimmung jeweils negativ.

4 Diskussion

4.1 Stellenwert und Treffsicherheit der konventionellen Perikardzytologie

Mannigfaltige benigne und maligne Erkrankungen können Ergüsse in den serösen Höhlen verursachen. In der medizinischen Literatur werden Aszites, Pleura- und Perikardergüsse häufig wenig differenziert betrachtet, obwohl sich Pathogenese, Ätiologie und Dignitätsverteilung deutlich unterscheiden. Hinzu kommt, dass in vielen Studien der Anteil untersuchter Perikardflüssigkeit sehr gering war.

Innerhalb der Gruppe der Perikardergüsse finden sich außerordentlich häufig als deren Ursache maligne Tumoren (Corey et al., 1993). Deswegen ist in der vorliegenden Studie die konventionelle und adjuvante Zytologie an Perikardergüssen isoliert betrachtet worden. Im Unterschied zu Aszites- und Pleuraergüssen entstehen Perikardergüsse im Rahmen hämodynamischer oder inflammatorischer Erkrankungen relativ selten (Gornik et al., 2005; Wilkes et al., 1995). Infolgedessen ist jeder Perikarderguss zunächst solange malignitätsverdächtig, bis der Verdacht entkräftet ist. Dies bestätigt auch eine am Schwerpunkt Cytopathologie der Universität Düsseldorf erarbeitete aktuelle Studie, die weltweit das größte Kollektiv von 456 Patienten zusammenfasst und von der die hier vorgelegte Arbeit einen Teilaspekt repräsentiert, hier erwiesen sich rund 45,5% der Perikardergüsse als „tumorzell-positiv“. In einer kleineren Studie von Dragoescu und Liu erwiesen sich 24,2% der 113 untersuchten Perikardergüssen als maligne (Dragoescu & Liu, 2013). Entscheidend ist zudem, dass sich die Therapie eines Perikardergusses zunächst an dem Maß der hämodynamischen Beeinträchtigung orientieren muss und zweitrangig an der zu Grunde liegenden Erkrankung (Erdmann, 2011). In der sekundären Behandlung unterscheiden sich die Therapieansätze von malignen und benignen Grunderkrankungen jedoch grundlegend. Bei benignen Ergüssen wird nachfolgend die ursächliche Erkrankung behandelt. Wurden indes Tumorzellen im Erguss zweifelsfrei diagnostiziert, bedarf es der Aufklärung, welcher Primärtumor zu Grunde liegt, um eine kausale tumorspezifische Therapie einzuleiten. Dabei ist die Prognose der Patienten mit einem neoplastischen Perikarderguss durch den *Primarius* und die Möglichkeiten einer sachgerechten malignitätsspezifischen Therapie bestimmt (Seeber, 2007), wobei primäre Neoplasien

des Perikards sehr selten auftreten (McKenna et al., 1985). Daraus ergibt sich, dass der prognostische und therapeutische Dreh- und Angelpunkt der Ausschluss oder Beweis von Malignität sowie die Bestimmung des *Primarius* ist. Somit kommt der Einschätzung der Treffsicherheit von konventioneller und adjuvanter Zytologie eine enorme Bedeutung zu.

Insbesondere für das Perikard schwanken die Beurteilungen der Aussagekraft der Ergusszytologie, so konnte in einer Studie von Krikorian und Hancock in 24% der Fälle von neoplastischen, chylösen und bakteriellen sowie hämorrhagischen Ergüssen durch angewandte Zytologie eine eindeutige Diagnose gestellt werden (Krikorian & Hancock, 1978). In Fällen einer karzinomatösen Perikardinfiltration konnte zu 100% eine korrekte zytologische Diagnose erfolgen. Corey et al. erzielten bei 26% der untersuchten Perikardergüsse eine eindeutige Diagnose (Corey et al., 1993), Meyers und Bouska erlangten eine Treffsicherheit von 94 % (Meyers & Bouska, 1989). Die Schwankungsbreite reicht bis hin zu einer erzielten Sensitivität von 92% (Meyers et al., 1997) und 100% von Malamou-Mitsi et al. (1996). In Studien von Merce et al. wird hingegen die routinemäßige Perikardpunktion mit anschließender Zytologie kontrovers diskutiert (Merce et al., 1998). Dem gegenüber stehen Untersuchungen von Kotte und McGuire, Wiener sowie von Karatolios, in der die zytopathologische Diagnostik eines Punktats befürwortet wird, weil sowohl die Diagnosefindung als auch Therapie und Prognose positiv beeinflusst werden (Karatolios et al., 2011; Kotte & McGuire, 1951; Wiener et al., 1991).

Die am Schwerpunkt Cytopathologie der Universität Düsseldorf entwickelte aktuelle Studie (n= 456), von der die hier vorgelegte Arbeit einen Teilaspekt repräsentiert, lässt erkennen, dass mithilfe der konventionellen Perikardzytologie bereits eine sehr gute Treffsicherheit von 85,5% Sensitivität und 97% Spezifität erreichbar ist (Dannenber, 2015). Dennoch bleibt auch sie von einer 100%-igen Treffsicherheit, gerade im Kollektiv der „zweifelhaften“ Fälle, noch deutlich entfernt, so dass Fehlerquellen der Diagnostik benannt werden müssen und adjuvante Methoden weiterhin eine tragende Rolle spielen.

Tabelle 27: Studien zur diagnostischen Treffsicherheit der konventionellen Perikardergusszytologie.

Studie	Fallzahl	Sensitivität	Spezifität
(Zipf & Johnston, 1972)	47	80%	100%
(Posner et al., 1981)	15	84,6%	100%
(Reyes et al., 1982)	9	100%	-
(Meyers & Bouska, 1989)	93	87%	100%
(Wiener et al., 1991)	95	-	100%
(Malamou-Mitsi et al., 1996)	25	100%	90,5%
(Meyers et al., 1997)	137	92%	100%
(Dragoescu & Liu, 2013)	113	71%	100%
(Dannenberg, 2015)	424	85,5%	97%

4.2 „*Screening-Error*“ und „*Sampling-Error*“ als Fehlerquellen der Perikardzytologie

Die Bemessung der Treffsicherheit, eine stetige Optimierung der zytologischen Diagnostik und Sensitivität ist dringend erforderlich, wobei eine damit verbundene Dezimierung der Spezifität aufgrund der gravierenden Folgen einer „falsch-positiven“ Diagnose vermieden werden muss (Koss, 2006). Als wichtigste Fehlerquellen in der Zytologie gelten der „*Screening-Error*“ und der „*Sampling Error*“. Ein „*Screening Error*“ liegt in der Verantwortung des Pathologen, wenn diagnostisch entscheidende Zellen übersehen oder zwar gesehen, aber letztlich falsch interpretiert werden. Die meisten Formen des „*Sampling Errors*“ sind vom Kliniker zu verantworten; hier sind ein zu geringes Entnahmenvolumen, ein falscher Entnahmeort oder eine falsche Fixierung, aufgrund derer keine ordnungsgemäße Verarbeitung und Beurteilung der Proben möglich ist, zu nennen (Motherby, Nadjari, et al., 1999). Der Pathologe muss allerdings dafür sorgen tragen, dass genügend Material aufgearbeitet wird; in Düsseldorf beispielsweise gründet sich die Diagnostik mindestens auf drei Sedimentausstriche à 24 * 60 mm Fläche (= 43 cm²), die um weitere ergänzt werden können, während manche andere Pathologen ihre Diagnostik auf zwei oder drei Zytozentrifugate à 12 mm Durchmesser beschränken (= 1,1 cm²). Zahlen darüber, welchen Anteil die beiden

Fehlerarten an Fehlinterpretationen an Ergüssen haben, liegen nicht vor; Schätzungen gehen von ca. einem Drittel „*Screening Error*“ und zwei Dritteln „*Sampling Error*“ aus.

4.3 Immunzytochemie als adjuvante Anwendung in der Zytologie

Die Anwendung adjuvanter Methoden in der Zytopathologie hat sich in Deutschland bezogen auf die Immunzytochemie zumindest in Ansätze durchgesetzt, wobei viele Institute nur wenige Marker für die Zytologie bereithalten, jedenfalls deutlich weniger als für die üblicherweise mit betriebene Histologie. Am Schwerpunkt für Cytopathologie der Universitätsklinik Düsseldorf ist allerdings eine Vielzahl von Markern etabliert, die bei verschiedenen diagnostischen Szenarien zum Einsatz kommen. In der Perikardzytologie geht es dabei um zwei diagnostische Ansätze, die im Folgenden separat diskutiert werden sollen:

- a) Zum einen wurde in den Fällen, bei denen nach der konventionellen Zytologie das Vorliegen von Tumorzellen im nicht bewiesen war („zweifelhaft“, „dringender Verdacht“) zu ihrem Ausschluss oder Nachweis eine Anwendung der epitheliale Zellen darstellenden Marker BerEP4 und HEA 125 und teilweise von Calretinin als „Gegenprobe“ zu Markierung mesothelialer Zellen versucht (Subkohorte 1, n = 29).
- b) Wurden indes bereits Tumorzellen unzweifelhaft in der konventionellen Zytologie nachgewiesen („positiv“), bedurfte es in diversen Fällen der Aufklärung, welcher *Primarius* zugrunde lag. Wobei in Fällen mit bereits bekanntem Tumorleiden üblicherweise auf eine solche Typisierung verzichtet wurde (Subkohorte 2, n = 47).

Zum anderen sollten die spezifischen Ursachen sowohl der malignen als auch der benignen Ergüsse geklärt und ein Häufigkeitsprofil erstellt werden. Etwaige geschlechtsspezifische Unterschiede sowie Altersverteilungen wurden herausgearbeitet. Außerdem wurden zwei Patientenfälle der Subkohorte 1, je einer „falsch-positiv“ und „falsch-negativ“, im Rahmen der Studie nachträglich mit immunzytochemischen Methoden untersucht. Dies geschah zur Ursachenfindung und um zu testen, in welchen Fällen eine nachträgliche Klärung möglich war. Neben den

Bemühungen durch adjuvante Methoden und Algorithmen die Treffsicherheit zu verbessern, spielten auch „diagnostische Grauzonen“ und „Interpretationsspielräume“ eine entscheidende Rolle. Die Einteilungskriterien für die Kategorien „zweifelhaft“ und „mit dringendem Verdacht“ sind nicht trennscharf definiert (Böcking & Freudenberg, 1998). Zudem hängt die zytologische Erscheinung von den Faktoren Vorerkrankungen, Punktionsmethode, Verarbeitung und Therapien ab. So können zum Beispiel bei vorheriger Chemotherapie oder Radiatio an sich „tumorzell-negative“ Präparate durch die Zellveränderung als „zweifelhaft“ oder „dringend verdächtig“ eingestuft werden. In einigen Studien werden diese „zweifelhaften“ und/oder „dringend verdächtigen“ Fälle nicht aufgeführt und wurden somit nicht in die Gesamtwertung mit einbezogen. Dies führt aber zu einer deutlichen Verfälschung der Ergebnisse, weil gerade in diesem Patientenkollektiv „tumorzell-positive“ Fälle eminent zu erwarten sind. Aus diesem Grund erfolgte in dieser Studie die Einbeziehung solcher Ergebnisse durch zwei verschiedene Wertungskategorien. In der ersten Wertungskategorie zählen die „dringend verdächtigen“ mit zu den „tumorzell-positiven“ Fällen, die „zweifelhaften“ wurden den „tumorzell-negativen“ Fällen zugeordnet. In der Wertungskategorie 2 zählen sowohl die „zweifelhaften“ als auch „dringend verdächtigen“ zu der Gruppe der „tumorzell-positiven“ Fälle. Dies führt durch den veränderten Betrachtungswinkel letztendlich zu einer differenzierteren Einschätzung der Treffsicherheit, unter besonderer Berücksichtigung der schwer einschätzbaren zytologischen Präparate. Außerdem wurden für die gesamte Subkohorte 1 (n=29) - bezogen auf die Wertungskategorie 1 und Wertungskategorie 2 - Auswertungen der statistischen Kennzahlen von immunzytochemischen Diagnostiken im Vergleich zu der zytologischen Diagnostik durchgeführt.

4.3.1 Immunzytochemie in der Tumordiagnostik

Bei einer Fallzahl von n=29 ergab sich für die klassische zytologische Diagnostik zum Tumornachweis oder – ausschluss, wenn man die „negativen“ und „zweifelhafte“ Fälle als abschließend „negativ“ und die „dringend verdächtigen“ und „positiven“ Fälle abschließend als „positiv“ ansah (Wertungskategorie 1), eine Sensitivität von 43,8%

und Spezifität von 84,6%. Der positive Prädiktionwert betrug 77,8%, der negative Prädiktionwert 55%. Die Wahrscheinlichkeit tatsächlich gesund zu sein, falls ein negatives Testergebnis vorliegt, belief sich also nur auf 55%, passend dazu lag die Falsch-Negativ-Rate bei 56,3%. Des Weiteren wurde eine Falsch-Positiv-Rate von 15,4% ermittelt. Die Gesamttreffer sicherheit erzielte einen Wert von 62,1%.

Für dasselbe Patientenkollektiv konnte in der selbigen Wertungskategorie durch die adjuvante Methodik der Immunzytochemie eine Sensitivität von 87,5% und Spezifität von 69,2% ermittelt werden. Die Sensitivität konnte somit um mehr als 40 Prozentpunkte angehoben werden, während jedoch die Spezifität um 15,4 Prozentpunkte sank. Der positive Prädiktionwert betrug 77,8%, während die Falsch-Negativ-Rate bei 12,5% und der negative Prädiktionwert bei 81,8% lagen. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit, gesund zu sein - falls ein negatives Testergebnis vorliegt – auf Grund der angewandten Diagnostik bei 81,8% liegt. Damit liegt eine deutliche Verbesserung durch die adjuvanten Methoden vor, denn im Vergleich lag ohne die Immunzytochemie der negative Prädiktionwert bei 55%. Die Gesamttreffer sicherheit erzielte einen Wert von 79,3% und war damit im Vergleich zur rein konventionellen Zytologie deutlich höher.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz der Immunzytochemie die Sensitivität, die Falsch-Negativ-Rate und die Gesamttreffer sicherheit entscheidend verbessern konnte und somit eine größere Zahl von Fällen aufklären konnte (s. Tabelle 28).

Tabelle 28: Gegenüberstellung der Treffersicherheit von zytologischer Diagnostik ohne adjuvante Methoden und mit adjuvanten Methoden an Perikardergüssen (n=29) .

Statistische Kennzahlen	Konventionelle Zytologie zum Tumornachweis in Wertungskategorie 1	Immunzytochemische Diagnostik zum Tumornachweis in Wertungskategorie 1
Sensitivität	43,8%	87,5%
Spezifität	84,6%	69,2%
„Falsch-Negativ-Rate“	56,3%	12,5%
„negative Prädiktionwert“	55%	81,8%
Gesamttreffer sicherheit	62,1%	79,3%

Geht man von der Wertungskategorie 2 aus, in der lediglich „negative“ Fälle als abschließend „negativ“ gewertet wurden und alle anderen, also die „zweifelhaften“,

„dringend verdächtigen“ und „positiven“ als abschließend „positiv“, so ergab sich für die konventionelle zytologische Diagnostik zum Tumornachweis oder -ausschluss auf der einen Seite eine Sensitivität von 94,4%. Allerdings sank im Gegenzug die Spezifität auf einen Wert von 0%. Die Falsch-Negativ-Rate lag bei 5,6%. Der positive Prädiktionswert betrug 78,6%, der negative Prädiktionswert 0%. Die Gesamttreffsicherheit erzielte einen Wert von 56,6%. Die Veränderung der statistischen Kennzahlen beruht dabei auf dem veränderten Blickwinkel, der sich durch die unterschiedliche Zuordnung der „zweifelhaften“ Fälle ergibt.

Für die immunzytochemische Diagnostik zum Tumornachweis oder -ausschluss ergab sich in Wertungskategorie 2 keine Veränderung, weil keine Proben nach erfolgter immunzytochemischer Diagnostik als „zweifelhaft“ eingestuft wurden, insofern stimmen die statistischen Kennzahlen mit denen der Auswertung aus Wertungskategorie 1 überein.

Neben der generellen Aufteilung in Wertungskategorien, wurde in dieser Studie zusätzlich explizit das Kollektiv der zytologisch „zweifelhaften“ Fälle (n=19) näher untersucht. Da (wie oben bereits erwähnt) in diesem Patientenkollektiv „tumorzell-positive“ Fälle stark zu vermuten waren, war es für adjuvante Diagnostik besonders interessant und prädestiniert: 19 Fälle waren nach der zytologischen Diagnostik „zweifelhaft“, 10 der Fälle waren tatsächlich „negativ“, 9 Fälle erwiesen sich im *Follow-Up* als „tumorzell-positiv“. Von diesen 9 malignen Ergüssen wurden durch immunzytochemische Marker 88,9% der Proben (n=8) als „tumorzell-positiv“ erkannt, insgesamt ergab sich eine Sensitivität der immunzytochemischen Untersuchung von 88,9% und Spezifität von 80%. Die Gesamttreffsicherheit der adjuvanten Diagnostik innerhalb der Gruppe zytologisch „zweifelhafter“ Fälle belief sich auf 84,2%. Ein Hinzuziehen der Immunzytochemie zur Abklärung der Dignität des Perikardergusses, erwies sich in dieser Gruppe als sehr sinnvoll, da auf diese Weise zytologisch noch nicht erfassbare maligne Erkrankungen richtig diagnostiziert werden konnten.

Die Literaturergebnisse bezüglich der diagnostischen Aussagekraft der Immunzytochemie in der Ergusszytologie (vgl. Tabelle 29), zeigt je nach Studie für den Marker BerEP4 eine Sensitivität von 32 – 77,8% und Spezifität bis zu 100% (De Angelis et al., 1992; Motherby, Friedrichs, et al., 1999; Motherby, Kube, et al., 1999; Shield et al., 1994).

Tabelle 29: Studien zur diagnostischen Aussagekraft adjuvanter Ergusszytologie.

Studie	Marker	Sensitivität	Spezifität
(Karatolios et al., 2011)	CA-72-4	69%	96%
(Motherby, Friedrichs, et al., 1999)	BerEP4	77,8%	100%
(Spehn et al., 1995)	BerEP4	52%	100%
(Arora et al., 2011)	BerEP4	98%	86%
(Shield et al., 1994)	BerEP4	32%	-
(Matter-Walstra & Kraft, 1996)	BerEP4	56%	100%
Vorliegende Studie: Immunzytochemie zum Tumornachweis (Wertungskategorie 1)	BerEp4, HEA125, Calretinin	87,5%	69,2%

In einer Studie von Motherby et al. - mit 7 perikardialen und 213 pleuralen sowie 85 peritonealen Ergüssen und 8 Lavagen - konnte die Verbesserung der diagnostischen Treffsicherheit der allgemeinen Ergusszytologie durch den Einsatz adjuvanter Methoden (Immunzytochemie (BerEP4) und/oder DNA-Zytometrie) bereits gezeigt werden (Motherby, 1999). Hier wurde, wie in Tabelle 30 ersichtlich, eine Verbesserung der Gesamttreffsicherheit von 78,2% auf 84,6% und eine Steigerung der Sensitivität von 53,4% auf 61% erzielt. Eine Auftrennung in Einzeleffekte der Immunzytochemie und der DNA-Zytometrie ließ die Arbeit aber leider nicht zu.

Tabelle 30: Ätiologie der Ergüsse seröser Körperhöhlen (Motherby, 1999), modifiziert nach Böcking (Böcking et al., 2000).

Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik der Ergüsse seröser Körperhöhlen		
Statistische Kennzahlen	Mit adjuvanter Methoden Immunzytochemie (BerEP4) und/oder DNA-Zytometrie (Aneuploidie) (%)	Ohne adjuvante Methoden (%)
Sensitivität	61,0	53,4
Spezifität	99,0	93,3
Gesamttreffsicherheit	84,6	78,2
Klassifikationsgenauigkeit	90,6	84,6
Anteil zytologisch unklarer Fälle in %	1,0	8,7

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in der Subkohorte 1 (n=29) in 29 Fällen BerEP4 und bei 23 Fällen HEA-125 als diagnostische Marker eingesetzt. Ferner wurde bei vier Fällen ergänzend auch Calretinin eingesetzt. Dies diente der Detektion von

Mesothelzellveränderungen, denn eine Calretinin-Positivität gilt als charakteristisch für Mesothelzellen und spricht somit gegen das Vorliegen einer Karzinose. Eine Calretinin-Expression vermag aber nicht zwischen einer reaktiven oder einer bösartigen Mesothelzellveränderung zu unterscheiden. Mit Hilfe dieses Markerpanels konnte im Zuge der vorliegenden Studie eine Sensitivität von 87,5% und eine Spezifität 69,2% erzielt werden.

4.3.2 Beurteilung der falsch-klassifizierten Fälle in der Tumordiagnostik

An dieser Stelle wird nun auf die falsch-klassifizierten Fälle in der Tumordiagnostik eingegangen. Es zeigte sich nach Wertungskategorie 1 bei sechs Fällen eine falsche Klassifizierung, von denen vier als „falsch-positiv“ (dringend verdächtig) und zwei als „falsch-negativ“ („zweifelhaft“ und „negativ“) ausgewertet wurden. Um mögliche Fehlerquellen auszuschließen, wurden diese Fälle erneut betrachtet und zwei Fälle nachuntersucht (s. Kapitel 3.5.3).

Ein besonderes Augenmerk soll zunächst auf die „falsch-positiv“-Rate gelegt werden, die tunlichst gering ausfallen sollte, um eine möglichst valide Spezifität zu erreichen. Vier von 29 Fällen wurden formal „falsch-positiv“ klassifiziert.

- In einem Fall wurden die immunzytochemischen Präparate der Probe noch einmal kontrolliert und die zum Zeitpunkt der originären Diagnostik als „positiv“ eingestufte Immunreaktion für BerEP4 und HEA-125 nachträglich als schwach angesehen. Da die Zellen in unverdächtigen Verbänden lagen, wurde zur Klärung der Frage, ob es sich nicht doch um reaktive Mesothelien handeln könnte, noch eine Calretinin-Immunzytochemie angeschlossen, die deutlich „positiv“ war. Fazit der ergänzenden Untersuchung war die Revision der Diagnose. Es lag somit ein „*Screening Error*“ in dem Sinne vor, dass eine schwache Immunreaktion nicht kritisch hinterfragt worden ist, sondern überinterpretiert wurde. Im Nachhinein weist die starke Positivität für den mesothelialen Marker Calretinin in Richtung reaktiver Mesothelien hin. Die falsche Zuordnung ereignete sich im Winter 2005, also noch in der Adaptionsphase der Immunzytochemie. Heute würde sich dieser Fehler so

nicht mehr ereignen, da in nur schwach BerEP4- und/oder HEA-125-reaktiven Proben Calretinin zur Unterscheidung von reaktiven Mesothelzellen oder Mesotheliomen von Karzinomen eingesetzt würde.

- In einem weiteren „falsch-positiven“ Fall verstarb der Patient am Tag der Probenentnahme an einer Sepsis, sodass das *Follow-Up* lediglich dem Evidenzlevel 1 entspricht. Dies bedeutet, dass ausschließlich aus dem Arztbrief eine dem zytologischen Befund entgegengesetzte Diagnose hervorgeht. Keine weitere Diagnostik widerlegt die immunzytochemische Expertise. Aus Sicht der Zytopathologie ist der Befund in sich stimmig, sodass man eher umgekehrt von einer klinisch nicht identifizierten Perikardkarzinose ausgehen sollte.
- Im dritten „falsch-positiven“ Fall stellte sich in der Nachbetrachtung heraus, dass eine unterdurchschnittliche Punktatmenge von 20 ml eingeschickt wurde, die deutlich unter der (vgl. Kapitel 2.2.1) empfohlenen Menge von 50 - 100 ml lag. Außerdem wurde am Tag der Perikardpunktion auch ein Biopsat entnommen und histologisch untersucht. Die Histologie ergab eine geringe Fibrose ohne Anhalt für Malignität, sodass das Follow-Up dem höchsten Evidenzlevel 6 entspricht. Allerdings stellt sich die Frage nach der Repräsentativität der Biopsie. Aus Sicht des Studiendesigns ist der Befund aber abschließend als „falsch-positiv“ zu bewerten.
- In dem letzten Fall stellte sich in der Nachbetrachtung ebenfalls heraus, dass der zytologische Befund auf einer unterdurchschnittlichen Punktatmenge von 14 ml basiert. Das *Follow-Up* entspricht nur dem Evidenzlevel 3, da lediglich aus dem Arztbrief und einer weiteren konventionellen Zytologie die Diagnose einer idiopathischen Perikarditis hervorgeht. Außerdem ist dem Brief zu entnehmen, dass der Patient ein starker Raucher war (80 Packungsjahre) und die empfohlene CT-Untersuchung 6-8 Wochen nach der Punktion nicht stattgefunden hat. Keine weitere Histologie oder Bildgebung widerlegt die immunzytochemische Expertise. Aus Sicht der Zytopathologie ist der Befund weiterhin als konsistent anzusehen, so dass der Fall nachträglich nicht eindeutig geklärt werden kann.

Die beiden falsch negativen Fälle lassen sich aus der Retrospektive folgendermaßen diskutieren:

- Bei einem Patienten (genaue Darstellung s. Kapitel 3.5.3) wurden innerhalb eines Zeitraums von 16 Monaten insgesamt sechs Perikardergüsse punktiert und untersucht (vgl. Tabelle **22**). Die Punktate 1, 2, 4 und 5 sind konventionell als „negativ“ beurteilt worden, das Punktat 3 hingegen als „zweifelhaft“. Punktat 6 stellte sich als „positiv“ dar.

Immunzytochemisch erwies sich Punktat 3 zum Zeitpunkt der originären Diagnostik als BerEP4- und HEA125-„negativ“ und wurde daher auch als „negativ“ klassifiziert. Fazit der nachträglichen Untersuchungen ist, dass es sich bei der immunzytochemischen Untersuchung der dritten Probe, welche zum Zeitpunkt der Erkrankung maßgeblich zu der Diagnose eines „negativen“ Ergusses führte, nicht um einen „*Screening-Error*“ handelte. Denkbar ist hingegen, dass die Ergussprobe 3 tatsächlich keine Tumorzellen enthielt oder dass es sich um einen „*Sampling-Error*“ handelte. Die immunzytochemische Nachuntersuchung der sechsten Probe, die fünf Monate später entnommen wurde, bestätigte die „positive“ Diagnose dieser Ergussprobe. Insofern liegt hier für die dritte Probe formal ein „falsch negativer“ Befund bezogen auf das klinische Endergebnis vor, die Probe selber kann als „richtig negativ“ interpretiert werden.

- Bei dem zweiten „falsch-negativen“ Fall wurden innerhalb eines Zeitraums von vier Wochen insgesamt fünf Perikardpunktate untersucht. Dabei wurden drei Punktate nur konventionell zytologisch untersucht, das Ergebnis war in allen drei Fällen „negativ“. Ein Biopsat wurde histologisch geprüft, auch hier wurde eine „negative“ Diagnose gestellt. Ein weiteres Punktat wurde zunächst konventionell zytologisch untersucht und als „dringend verdächtig“ eingestuft. Die folgende Immunzytochemie stufte den Erguss jedoch als „negativ“ ein und entsprach somit den vorherigen Untersuchungen. Das *Follow-Up* ist dem Evidenzlevel 1 zuzuordnen, da lediglich aus dem Arztbrief die Diagnose eines malignen Perikardergusses hervorgeht. Allgemeinanamnestisch ist festzuhalten, dass der Patient mit reduziertem Allgemeinzustand und Dyspnoe

in einer Klinik vorstellig wurde. Zunächst wurde ein Pleura- und Perikarderguss diagnostiziert, außerdem konnte ein Lungenkarzinom als *Primarius* der diffusen Milz- und Lebermetastasen identifiziert werden. Aus Sicht der Zytopathologie ist der Befund in sich stimmig. Man kann eher davon ausgehen, dass der Kliniker, im Kontext der metastasierenden Karzinose, den Perikarderguss vorschnell als maligne eingestuft hat. Vielmehr ist es denkbar, dass der Perikarderguss tatsächlich benigne war und auf Grund einer Lymphabflussbehinderung (bedingt durch das Bronchialkarzinom) entstanden ist. Der Patient ist im Verlauf der hochpalliativen Chemotherapie verstorben.

4.3.3 Immunzytochemie in der Tumortypisierung

Neben der Fragestellung, inwieweit die Treffsicherheit der Perikardergusszytologie durch Immunzytochemie verbessert werden kann, sollte ebenfalls beantwortet werden, wie exakt bei bereits „tumorzell-positiven“ Fällen die Bestimmung des zu Grunde liegenden *Primarius* war. Untersuchungen mit dem Ziel der Typisierung bilden die Subkohorte 2 (n=47). Innerhalb dieser Subkohorte konnte zu 89,4% eine korrekte Typisierung vorgenommen werden, dabei wurden 96,7% aller Bronchialkarzinome (n=30) fehlerfrei typisiert. Bei Mammakarzinomen (n=3), Ovarialkarzinomen (n=2) und Mesotheliomen (n=3) konnte zu 100% eine richtige Typisierung erfolgen. Für die häufigsten *Primarii* (Bronchialkarzinome, Mammakarzinome und Mesotheliome) konnten also eine Treffsicherheit von 97% (35/36) erzielt werden.

Literatur, die sich speziell mit der immunzytochemisch basierten Tumortypisierung an Perikardergüssen befasst, gibt es nicht, hingegen einige Arbeiten zu Körperhöhlenergüssen im Allgemeinen.

Eine systematische Studie von Pomjanski et al., die ebenfalls in der Cytopathologie in Düsseldorf durchgeführt worden war, untersuchte an 180 Körperhöhlenergüssen, zu denen auch neun Perikardergüsse gehörten, die Treffsicherheit eines fest definierten immunzytochemischen Markerpanels, bestehend aus sechs Markern (CK5/6, CK7, CK20, TTF1, CDX2, CA125). Es konnte dabei eine Genauigkeit der Primärtumor-Identifizierung von 85,1% erzielt werden (Pomjanski et al., 2005).

In einer Untersuchung von DeYoung und Wick wurden ebenfalls mit Hilfe der Immunzytochemie die *Primarii* von metastasierenden Karzinomen unbekanntes Ursprungs (CUP) untersucht. Die Gesamttrefferquote der Typisierung ergab 67% (DeYoung & Wick, 2000). In einer weiteren Studie von Lagendijk gelang die Typisierung von Kolon- und Ovarkarzinomen mit einer Trefferquote von 87% (Lagendijk et al., 1998). Im Kontext der genannten Studien und Literatur (s. Tabelle 31) konnte also in der vorliegenden Studie eine gleich hohe Trefferquote bei der Typisierung eines *Primarius* erreicht werden, wie in der Studie von Pomjanski et al. (2005).

Tabelle 31: Studien zur diagnostischen Trefferquote der Typisierung.

Studie	Marker	Tumoren	Trefferquote
(DeYoung & Wick, 2000)	multipel	CUP	67%
(Pomjanski et al., 2005)	CK5/6, CK7, CK20, TTF1, CDX2, CA125	CUP	85,1%
(Lagendijk et al., 1998)	CK7, CK20, Vimentin, CEA 125,, CEA	Kolon, Ovar	87%
Vorliegende Studie Subkohorte 2	CK5/6, CK7, CK20, TTF1, CDX2, CA125	multipel	89,4%

Die vorliegende Studie zeigt analog zur Beurteilung einiger Autoren (Krüger et al., 1992; Rubin et al., 2001), dass sich der Einsatz der Immunzytochemie als adjuvante Methode zur Identifizierung des Primärtumors klinisch unbekannter Herkunft an „tumorzell-positiven“ Perikardergüssen sehr gut eignet. Zudem ist die Immunzytochemie methodisch leicht durchzuführen.

Zur markerspezifischen Betrachtung (s. Tabelle 26) der häufigsten *Primarii* eines malignen Perikardergusses fand man die qualitative Auswertung der Fälle mit positiver Immunreaktion statt. Diese definiert sich wie folgt und wird in Prozent (%) angegeben: Summe der „markerpositiven“ Fälle dividiert durch die Anzahl der getesteten Fälle. Zum anderen wurde bei „positiver“ Immunreaktion, der *Score* errechnet. Dabei handelt es sich um die quantitative Parameterevaluation, die sich wie folgt darstellt: Anzahl angefärbter Tumorzellen geteilt durch die Gesamtumorzellzahl. Untersucht wurden die sechs am häufigsten angewandten Marker (CK5/6, CK7, CK20, TTF1, CDX2, CA125).

Die Zytokeratine 5 und 6 dienen als diagnostische Marker zur Differenzierung zwischen den meist „positiven“ Plattenepithelkarzinomen und den ebenfalls meist „positiven“ Mesotheliomen von den Adenokarzinomen der Lunge, welche meist „negativ“ reagieren (P. G. Chu & Weiss, 2002; Pu et al., 2008); dies konnte speziell für CK5 schon in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts von Blobel gezeigt und von Moll später erneut bestätigt werden (Blobel et al., 1985; Moll et al., 1989). In der bereits erwähnten Untersuchung von Pomjanski et al. konnte zudem eine CK5/6 Positivität von 77% bei Mammakarzinomen, 100% bei Pankreaskarzinomen und 78% bei Magenkarzinomen gezeigt werden (Pomjanski et al., 2005). In Rahmen der vorliegenden Studie konnten wir eine CK5/6 Expression für 100% der Mammakarzinome (n=3), 50% der ovariellen Karzinome (n=2) und 88,5% der Lungenkarzinome nachweisen, wobei im Kollektiv der Lungenkarzinome ein hoher Anteil von Plattenepithelkarzinomen vertreten ist.

Das Zytokeratin 7 ist singularär betrachtet kein valider Marker für einen *Primarius*, aber ein sehr guter Marker für ein Adenokarzinom im Allgemeinen, sodass dieser Marker insbesondere wichtig bei der Abgrenzung gegenüber den CK7-„negativen“ Plattenepithelkarzinomen ist. Zytokeratin 20 ist isoliert betrachtet bereits ein potenter Marker für kolorektale Karzinome (P. Chu et al., 2000). In der Gesamtbetrachtung aller Marker und vor allem der Vergleichsbetrachtung der CK7 und CK20 Expression lassen sich wichtige diagnostische Schlüsse bezüglich des *Primarius* ziehen: in den nachbenannten Studien konnte gezeigt werden, dass eine Expression CK7 < CK20 für das Vorliegen von Metastasen kolorektalen Ursprungs spricht (P. Chu et al., 2000; Goldstein et al., 2000; Rubin et al., 2001; Shin et al., 2010; Tot, 1999a). So konnte Shin et al. in 82,5% der Fälle korrekt zwischen primären Ovarialkarzinomen und ovariellen Metastasen kolorektaler Karzinome unterscheiden.(Shin et al., 2010). Die Konstellation CK7 > CK20 zeigte sich Studien zu Folge bei Adenokarzinomen der Lunge zu 100%, bei Adenokarzinomen der Mamma und des Ovars fiel der Wert (87-88%) etwas geringer aus (Jang et al., 2001; Su et al., 2006). Ähnliche Ergebnisse konnten ebenfalls in anderen Studien präsentiert werden (Pomjanski et al., 2005; Stopyra et al., 2001; Tot, 1999b). Auch in der hier vorliegenden Studie konnte dieser Expressionsphänotyp für Adenokarzinome der Lunge, Mamma und des Ovars bestätigt werden; der genaue Algorithmus ist in Tabelle 32 ersichtlich.

Tabelle 32 : Detektion des *Primarius* durch Markerkonstellationen.

Markerkonstellation	Wahrscheinlicher <i>Primarius</i> bei Vorliegen eines Perikardergusses
Score CK7 > Score CK20 ($\neq 0$) mit oder ohne CK5/6 und TTF1 „positiv“:	Lunge
Score CK7 > Score CK20 ($\neq 0$) mit CK5/6:	Mamma
Score CK7 > Score CK20 ($= 0$) mit Positivität von CA125:	Ovar

Der durchschnittliche *Score* der TTF-1 Expression liegt bei 3,4. Diverse Untersuchungen haben bereits die diagnostische Treffsicherheit von TTF1 sowohl bei primären als auch metastasierenden Lungenadenokarzinomen untersucht (Afify & al-Khafaji, 2002; Bingle, 1997; Jiang et al., 2008; Kaufmann & Dietel, 2000; Ordonez, 2000b; Reis-Filho et al., 2000; Zhu & Michael, 2007). In diesen Studien konnte analog zu den von uns ermittelten Daten gezeigt werden, dass TTF-1 ein spezifischer Marker für die Detektion von Adenokarzinomen der Lunge ist. Die im Rahmen der vorgenannten Studien ermittelten Sensitivitäten des Markers TTF1 liegen bei 61,5%-89%, während die erzielte Spezifität des Markers TTF1 zwischen 97%-100% einzuordnen ist.

CA125 wird häufig für den Nachweis ovarialer Karzinosen und/oder Metastasen eingesetzt (Duffy et al., 2005; Heinonen et al., 1985; Leake et al., 1994; Nap, 1998). In einer Studie von Cuijpers konnte in 96% eine positive Expression von Metastasen ovarialen Ursprungs festgestellt werden (Cuijpers et al., 1993). Allerdings ist die Verlässlichkeit und Aussagekraft dieses Markers (besonders in der Ergusszytologie) begrenzt, da sich auch bei Karzinomen anderer Organe, wie z.B. der Lunge, Schilddrüse, Cervix und des Gastrointestinaltraktes eine „positive“ CA125-Expression zeigt (Koelma et al., 1987; Loy et al., 1992; Ogmundsdottir et al., 1996; Topalak et al., 2002; Zhu & Michael, 2007). Einer aktuellen Studie zufolge ist besonders bei weniger aggressiven ovarialen Karzinomen die Validität von CA125 begrenzt (Kristjansdottir et al., 2013). Im vorliegenden Patientenkollektiv konnten wir - analog zu den zuvor erwähnten Studien - eine für Karzinome ausgehend von der Lunge, der Mamma und dem Ovar jeweils zu 100% eine positive CA125 Expression nachweisen. Der durchschnittliche *Score* bei ovarialen Karzinomen lag bei 5.

Die Einzelbetrachtung der Marker führt zu dem Fazit, dass die alleinige und isolierte Betrachtung der jeweilige Marker oft keine hinreichende Aussagekraft besitzt. Hingegen ermöglicht die Gesamtbetrachtung der Markerkonstellation im Kontext des klinischen und histomorphologischen Gesamtbefundes (Kaufmann et al., 2002) sowie der in Kapitel 2.2.7 vorgestellte Algorithmus eine zielführende und valide Diagnostik (s. Tabelle 32 und Abb.10).

4.3.4 Beurteilung der falsch-typisierten Fälle in der Tumortypisierung

An dieser Stelle wird nun auf alle falsch typisierten Fälle eingegangen. Es zeigte sich in fünf von 47 Fällen eine falsche Klassifizierung (vgl. Tabelle 25).

Tabelle 25: Darstellung der tatsächlichen Diagnose und des Färbeergebnisses im Kollektiv der falschen Typisierungen.

Malignom (Anzahl)	Fälschliche Typisierung	Färbeergebnis Marker: Score
Bronchialkarzinom (1)	Vermutlich Magen-/ Pankreaskarzinom (1)	CK5/6: 5, CK7: 5, CK20: 5, CDX2: 0, TTF1: 0
Cervixkarzinom (1)	Vermutlich Mammakarzinom(1)	CK 5/6:4, CK7:5, CK20: 0, CA125:0, Mammaglobin: 1, CDX2: 1, TTF1: 0
Melanom (1)	Hämorrhagischer Erguss mit aktivierten Mesothelien (1)	HMB 45: 0, Melan A: 0, Calretinin: 1
Ösophaguskarzinom (1)	Bronchialkarzinom (1) Geringe immunzyto- chemische Reaktivität	CK5/6: 1, CK7: 2, CK20: 1, CDX2: 0, TTF1: 0
Morbus Hodgkin (1)	Perikarderguss mit ausgeprägter lymphatischer Infiltration(1)	CD 20: 2% der lymphatischen. Zellpopulation „positiv“, Cd Ro 45: 98% der lymphatischen. Zellpopulation „positiv“

Betrachtet man diese Fälle nun differenzierter, indem man versucht, die diagnostischen Überlegungen aus der Zeit der Diagnostik nachzuvollziehen, so kommt man zu folgenden Schlüssen:

- Zum erstgenannten Fall gibt es nur noch den schriftlichen Befund, aber keinen Einsendeschein mehr, aus welchem sich die Indikationen zu einem bestimmten Markereinsatz retrospektiv ableiten lassen. Aus der Retrospektive lässt sich vermuten, dass der Einsendeschein keine Verdachtsdiagnose vorgab. Dafür

spricht die Wahl der drei (jeweils positiven) differentiellen Zytokeratine und der beiden für Darm bzw. Lunge relativ spezifischen (und jeweils negativen) Marker CDX-2 und TTF-1 als typisches „Screeningprofil“ für häufige Organkarzinome. In der Tat wäre das Ergebnis der Immunzytochemie mit einem Magen- oder Pankreaskarzinom durchaus vereinbar, ist aber in keiner Weise hierfür beweisend. Dass sich hinterher doch ein Bronchialkarzinom herausstellte, spricht nicht gegen die Sinnhaftigkeit eines Einsatzes von TTF-1 als „Lungenkrebsmarker“ - erfahrungsgemäß ist circa in einem Viertel der Fälle keine TTF-1-Expression nachweisbar.

- Der Fall einer Perikardergussbildung, der mit einer deutlichen Expression von CK 5/6 und CK 7 sowie einer schwachen Expression von Mammaglobin am ehesten in Richtung eines Mammakarzinoms interpretiert wurde, erwies sich später als Zervixkarzinom. Klar ist, dass eine Mammaglobinexpression trotz des Namens des Markers nicht spezifisch für ein Mammakarzinom ist, sondern auch bei anderen genitalen Karzinomen der Frau auftreten kann. Wahrscheinlich hat man an die Mamma insbesondere wegen der anatomischen Nähe der Organe zum Perikard gedacht. Bis heute ist, auch sechs Jahre später, noch kein wirklich „spezifischer“ Marker für Mammakarzinome gefunden. Abschließend ist die Typisierung als falsch anzusehen. Auf dem Einsendeschein fanden sich abgesehen von dem Wort „Perikard“ keine weiteren Angaben.
- Im Falle des nicht erkannten Melanoms konnte durch eine nachträgliche Beurteilung das Vorliegen auffälliger Zellgruppen bestätigt werden. Die immunzytochemischen Präparate wurden noch einmal beurteilt und die Färbung mit den Markern HMB45 und Melan A erneut als negativ angesehen. Zudem lagen die Zellen in unverdächtigen Verbänden, sodass sich im Kontext der Calretinin-Expression doch eher ein Hinweis auf eine reaktive mesotheliale Veränderung ergab. Fazit der nachträglichen Begutachtung ist, dass es sich bei der immunzytochemischen Untersuchung nicht um einen „*Screening-Error*“ handelte. Denkbar ist hingegen, dass der untersuchte Erguss - trotz klinisch bekanntem metastasierenden Melanoms - tatsächlich keine Tumorzellen enthielt. Eine weiterführende Aufklärung ist hier nicht mehr möglich.

- Im Falle des nicht erkannten Ösophaguskarzinoms ist die immunzytochemische Reaktivität insgesamt schwach ausgefallen. Der für Adenokarzinome der Lunge typische Marker TTF-1 war negativ, sodass die Interpretationsmöglichkeiten eingeschränkt waren. Einen beweisenden Marker für Adenokarzinome des distalen Ösophagus gibt es leider nicht. Klinisch war kein Verdacht auf einen Tumor gegeben; auf dem Einsendeschein ist ein unklarer Perikarderguss bei bekannter chronisch obstruktiver Lungenerkrankung mit Ruhedyspnoe beschrieben.
- Der Fall, der sich im *Follow-Up* als Morbus Hodgkin herausstellte, wurde durch den Kliniker mit der allgemeinen Angabe einer unklaren mediastinalen Raumforderung eingesandt, sodass hier (bei einem 65-jährigen Mann) neben einem in das Mediastinum metastasierten Bronchialkarzinom auch ein malignes Lymphom in Frage kam. Ein solches erschloss sich aber (bei zellreichem und lymphozytär geprägten Zellbild) in der konventionellen Zytologie nicht. Die Differenzierung nach B- und T-Zellen ergab ein für Ergüsse typische Bild. Es zeigten sich viele „CD-45-Ro-positive“ und damit als T-Zellen einzustufende Zellen. Hodgkin- oder Sternberg-Reed-Zellen als Äquivalent für einen Morbus Hodgkin lagen nicht vor. Ob hier dem Erguss letztendlich überhaupt ein Infiltrat des Morbus Hodgkin zugrunde lag oder ob möglicherweise hämodynamische Folgen des raumfordernden Lymphoms als „gutartige“ Ursache zu bedenken sind, lässt sich abschließend nicht mehr auflösen.

4.4 Ergussätiologie

Des Weiteren war Ziel der vorliegenden Arbeit, auf Basis der untersuchten Fälle, Ursachen für die Perikardergussentstehung zu ermitteln. Hierzu wurden die Patientenfälle beider Subkohorten gemeinsam betrachtet. Bei den benignen Ergüssen (n=14) ergaben die zytologischen Auswertungen nur unspezifische Ergebnisse hinsichtlich der Ursache für die Ergussentstehung, was auch ex aequo in der

Fachliteratur über die letzten Jahrzehnte hinweg bestätigt wird (Dragoescu & Liu, 2013; Flannery et al., 1975).

Die „tumorzell-negativen“ Ergüsse konnten durch das im Anschluss erfolgte *Follow-Up* in Anlehnung an Böcking (2000) und Abdallah et al. (2014) in fünf Ursachengruppen unterteilt werden:

- 1) idiopathische Ergüsse
- 2) entzündliche Ergüsse
- 3) systemisch bedingte Ergüsse
- 4) stauungsbedingte Ergüsse
- 5) iatrogene / traumatische Ergüsse

Mit 43% bilden die idiopathischen Ergüsse in dieser Studie den Hauptvertreter. Somit verdeutlicht dieser unbefriedigend hohe Anteil, dass bei über 40% der Fälle im Zuge des *Follow-Ups* keine Klärung der Ursache - trotz ausgiebiger klinischer Diagnostik zum Zeitpunkt der Erkrankung - möglich war. Einen sehr hohen Anteil an nicht spezifizierten Perikardergüssen beschrieb auch Fernandes et al. (1998) und Levy (2003) in ihren Studien.

Die weiteren Perikardergüsse wurden in absteigender Häufigkeit von entzündlichen Prozessen (36%), durch systemische Ursachen (14%) und zuletzt durch Stauungen (11,7%) hervorgerufen.

Ebenso konnte im Zuge des *Follow-Ups* bei keinem Patienten eine HIV-Infektion nachgewiesen werden. Einen möglichen Zusammenhang zwischen benignen Perikardergüssen und dem HI-Virus, wie er von Kwan et al. (1993) und Gouny (Gouny et al., 1998) beschrieben wurde, konnte also nicht näher untersucht werden. Aber auch das Fehlen von HIV-Infektionen im Patientenkollektiv der benignen Ergüsse spricht vordergründig nicht für einen bestehenden Zusammenhang. Evidenzbasierende Aussagen können auf Grundlage der hier vorliegenden Studie jedoch nicht getroffen werden.

Bei Betrachtung der „tumorzell-positiven“ Perikardergüsse war geschlechtsübergreifend in 55,6% der Fälle ein Bronchialkarzinom ursächlich. Mammakarzinome waren insgesamt in 14,3% der Fälle der *Primarius*, bei isolierter Betrachtung der Frauen sogar in 29% der Fälle. Diese Werte entsprechen den Veröffentlichungen des

Statistischen Bundesamtes für das Jahr 2003. Dort belegt das Bronchialkarzinom innerhalb der Gruppe bösartiger Neubildungen Platz eins. Als zweithäufigste Ursache tumorbedingter Todesfälle werden dort kolorektale Karzinome gefolgt von Mammakarzinomen angegeben (Seeber, 2007).

Neben der generellen Häufigkeit von Bronchialkarzinomen und Mammakarzinomen spielen bei malignen Perikardergüssen auch die direkte anatomische Lagebeziehung von Perikard, Lunge und Mamma eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung, da Karzinome umso häufiger ins Herz bzw. den Herzbeutel absiedeln, je näher sie diesen Strukturen liegen (Fiala & Schneider, 1982), ohne dass damit Metastasierungen aus weiter entfernten Organen formal ausgeschlossen wären. In der hier vorliegenden Studie wurden mehr als die Hälfte (55,6%) der malignen Ergüsse von einem Lungenkarzinom ausgelöst, eine vergleichbare Häufung des *Primarius* ist in der Literatur zahlreich beschrieben (Dragoescu & Liu, 2013; Garcia-Riego et al., 2001; Goldman & Pearson, 1965; Haskell & French, 1985; Jeong et al., 2012; Young & Goldman, 1954).

Bei isolierter Betrachtung männlicher Patienten steigt der Anteil der Lungenkarzinome, weil bei diesen die Brustdrüsen als *Primarius* nahezu gänzlich ausscheiden, sodass in 65,6 % der Fälle die Lunge der *Primarius* ist. Sodann folgen bei Männern mit 9,4% die malignen Mesotheliome, während sie im geschlechterübergreifenden Ranking mit 6,4% auf dem dritten Platz liegen. Lymphome waren nur bei 4,8% ursächlich für die malignen Perikardergüsse. Obwohl einige Autoren starke Herzmetastasierungen bei Lymphomen und Leukämien beschreiben (Fiala & Schneider, 1982), konnten diese Malignome, wie auch schon in einer Studie nach Malamou-Mitsi et al. (1996), in der vorliegenden Studie nur in wenigen Fällen als Primarien identifiziert werden.

4.5 Fazit

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass eine deutliche Steigerung der diagnostischen Sicherheit der Ergusszytologie durch die Anwendung der adjunktiven Methode der Immunzytochemie erreicht wird. Das manifestierte sich in dieser Studie mit einer Genauigkeit der Primärtumor-Typisierung von 89,4% und einer Sensitivität

von 87,5% bei der Dignitätsbestimmung in Wertungskategorie 1 (Normalfall). Die Gesamttreffsicherheit zum Tumorauschluss oder -nachweis belief sich mit adjuvanter Diagnostik bei zytologisch „zweifelhaften“ Fällen auf hohe 84,2%.

Die Durchführung immunzytochemischer Untersuchungen ist an Perikardergüssen bei entsprechender Indikation somit empfehlenswert und diagnostisch nützlich. Vom Prinzip her ist jeder Perikarderguss hierfür auch technisch geeignet, sofern man Alkohol-fixierte Präparationen hergestellt hat oder einen Zellblock aus koagulierte Material verwenden kann.

Aus zeitlicher Sicht ist zu sagen, dass die Immunzytochemie als ergänzende Methode einen bis zwei Arbeitstage länger braucht als die konventionelle Diagnostik, dafür aber den Vorteil größerer Präzision bietet. Nur wenige Konstellationen sind denkbar, in denen diese zusätzliche Zeit zu lang erscheint, beispielsweise über Ostern, wo zusätzlich vier aufeinander folgende arbeitsfreie Tage berücksichtigt werden müssen und in bestimmten Jahren über Weihnachten, wo an fünf Tagen nacheinander nicht gearbeitet wird, wenn Heiligabend auf einen Montag oder einen Mittwoch fällt. In solchen Sondersituationen könnte dann entsprechend bis zu eine Woche bis zum Ergebnis der Untersuchung vergehen, die dann in manchen Situationen (z.B. zunehmende obere Einflusstauung und zunehmende ergussbedingte Herzinsuffizienz bei V.a. hochmalignes Lymphom versus kleinzelliges Karzinom) zum therapeutischen Handeln zwingen könnte.

Zum Kosten-/Nutzen-Verhältnis ist aus dem Blickwinkel der anfordernden Kliniken anzumerken, dass ihnen durch die Zusatzuntersuchungen zwar Mehrkosten entstehen, diese aber im Kontext der Anwendung der Methode auf relativ wenige Fälle gesehen werden muss - in der Gesamtstudie (Dannenber, 2015) lag der Anteil immunzytochemisch untersuchter Fälle bei 18,4%. Kostet eine Untersuchung eines Perikardergusses (gemäß der sogenannten „Krankenhauspauschale“ in Nordrhein-Westfalen für jede erbrachte Pathologie-Leistung) derzeit 42 €, so kommen pro Marker weitere 21 € hinzu.

Die Kosten für den Leistungserbringer werden hierdurch nicht gedeckt, vielmehr wird das strukturelle Defizit der klinischen Zytologie weiter erhöht, da eine Immunzytochemie, berücksichtigt man Sachkosten und Personalkosten, nicht für 21 € erbracht werden kann. Im Durchschnitt kann man davon ausgehen, dass nur etwa 50%

der Kosten pro Leistung erwirtschaftet werden können - was einmal mehr begründet, warum viele Pathologien kein Interesse an einer Etablierung bzw. Ausweitung des Bereiches der nicht-gynäkologischen Zytologie haben. Am Schwerpunkt Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität beispielsweise müssten rein zur Kostendeckung pro Patient ca. 27 € mehr erwirtschaftet werden, ohne dass weitere Kosten hierbei entstünden.

5 Literaturverzeichnis

- Abdallah, R., & Atar, S. (2014). Etiology and characteristics of large symptomatic pericardial effusion in a community hospital in the contemporary era. *QJM*.
- Ackerman, L. V. (1996). *Ackerman's surgical pathology. 1* (Vol. 8. ed.). St. Louis u.a: Mosby.
- Ackerman, L. V., & Ackerman, L. (1996). *Ackerman's surgical pathology. 2* (Vol. 8. ed.). St. Louis u.a: Mosby.
- Afify, A. M., & al-Khafaji, B. M. (2002). Diagnostic utility of thyroid transcription factor-1 expression in adenocarcinomas presenting in serous fluids. *Acta Cytol*, 46(4), 675-678.
- al-Nafussi, A., & Carder, P. J. (1990). Monoclonal antibodies in the cytodiagnosis of serous effusions. *Cytopathology*, 1(2), 119-128.
- Apodaca-Cruz, A., Villarreal-Garza, C., Torres-Avila, B., Torres, J., Meneses, A., Flores-Estrada, D., . . . Arrieta, O. (2010). Effectiveness and prognosis of initial pericardiocentesis in the primary management of malignant pericardial effusion. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 11(2), 154-161.
- Arlettaz, L., Barbey, C., Dumont-Girard, F., Helg, C., Chapuis, B., Roux, E., & Roosnek, E. (1999). CD45 isoform phenotypes of human T cells: CD4(+)CD45RA(-)RO(+) memory T cells re-acquire CD45RA without losing CD45RO. *Eur J Immunol*, 29(12), 3987-3994.
- Arora, R., Agarwal, S., Mathur, S. R., Verma, K., Iyer, V. K., & Aron, M. (2011). Utility of a limited panel of calretinin and Ber-EP4 immunocytochemistry on cytopspin preparation of serous effusions: A cost-effective measure in resource-limited settings. *Cytojournal*, 8, 14.
- Aumüller, G., Aust, G., Doll, A. (2010). *Duale Reihe Anatomie* (Vol. 2. Auflage). Stuttgart: Thieme.
- Avrameas, S. (1969). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*, 6(1), 43-52.
- Barbareschi, M., Murer, B., Colby, T. V., Chilosi, M., Macri, E., Loda, M., & Doglioni, C. (2003). CDX-2 homeobox gene expression is a reliable marker of colorectal adenocarcinoma metastases to the lungs. *Am J Surg Pathol*, 27(2), 141-149.
- Battegay, E. (2013). *Siegenthalers Differenzialdiagnose* (Vol. 20. Auflage). Stuttgart: Thieme.
- Bedrossian, C. W. (1998). Diagnostic problems in serous effusions. *Diagn Cytopathol*, 19(2), 131-137.
- Bedrossian, E. W. M. (1994). *Malignant Effusions: A Multimodal Approach to Cytologic Diagnosis*. New York-Tokyo: Igaku-Shoin Medical Publishers.
- Berg, M., Heisel, A., Ukena, D., Schafers, H. J., & Schieffer, H. (1997). [Treatment of malignant pericardial effusion]. *Med Klin (Munich)*, 92 Suppl 5, 27-30.
- Berglund, E., Sarnoff, S. J., & Isaacs, J. P. (1955). Ventricular function: role of the pericardium in regulation of cardiovascular hemodynamics. *Circ Res*, 3(2), 133-139.

- Beutner, E. H., Holborow, E. J., & Johnson, G. D. (1965). A new fluorescent antibody method: mixed antiglobulin immunofluorescence or labelled antigen indirect immunofluorescence staining. *Nature*, 208(5008), 353-355.
- Bibbo, M. (1997). *Comprehensive cytopathology*. Philadelphia: WB Saunders Company.
- Bingle, C. D. (1997). Thyroid transcription factor-1. *Int J Biochem Cell Biol*, 29(12), 1471-1473.
- Bisel, H. F., Wroblewski, F., & Ladue, J. S. (1953). Incidence and clinical manifestations of cardiac metastases. *J Am Med Assoc*, 153(8), 712-715.
- Blobel, G. A., Moll, R., Franke, W. W., Kayser, K. W., & Gould, V. E. (1985). The intermediate filament cytoskeleton of malignant mesotheliomas and its diagnostic significance. *Am J Pathol*, 121(2), 235-247.
- Böcking, A. (1995). *DNA measurements. When and Why. Compendium on Quality Assurance, Proficiency Testing and Workload Limitations in Clinical Cythology* (C. K. GL Wied, DL Rosenthal Ed.).
- Böcking, A., & Freudenberg, N. (1998). Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie. *Pathologe*, 19, 235-258.
- Böcking, A., Motherby, H., & Pomjanski, N. (2000). Treffsicherheit der Ergusszytologie samt adjuvanten Untersuchungsmethoden. *Deutsches Ärzteblatt*, 40.
- Bölefahr, M. A. (2011). *Diagnostische Treffsicherheit der Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) mit adjuvanter DNA-Zytometrie bei malignomverdächtigen pankreatischen Raumforderungen*. (Med. Diss.), Heinrich Heine Universität Düsseldorf.
- Burazor, I., Imazio, M., Markel, G., & Adler, Y. (2013). Malignant pericardial effusion. *Cardiology*, 124(4), 224-232.
- Burchardi, H., Larsen, R., Kuhlen, R., Jauch, K.-W., & Schölmerich, J. (2008). *Die Intensivmedizin* (Vol. 10. Auflage). Heidelberg: Springer.
- Busam, K. J., Chen, Y. T., Old, L. J., Stockert, E., Iversen, K., Coplan, K. A., . . . Jungbluth, A. A. (1998). Expression of melan-A (MART1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Surg Pathol*, 22(8), 976-982.
- Carrillo, R., Sneige, N., & el-Naggar, A. K. (1994). Interphase nucleolar organizer regions in the evaluation of serosal cavity effusions. *Acta Cytol*, 38(3), 367-372.
- Chan, J. K. (2000). Advances in immunohistochemistry: impact on surgical pathology practice. *Semin Diagn Pathol*, 17(3), 170-177.
- Chejfec, G., Falkmer, S., Grimelius, L., Jacobsson, B., Rodensjo, M., Wiedenmann, B., . . . Gould, V. E. (1987). Synaptophysin. A new marker for pancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Surg Pathol*, 11(4), 241-247.
- Chheng, D. C., Yee, H., Schaefer, D., Cangiarella, J. F., Jagirdar, J., Chiriboga, L. A., . . . Cohen, J. M. (2000). Calretinin staining pattern aids in the differentiation of mesothelioma from adenocarcinoma in serous effusions. *Cancer*, 90(3), 194-200.
- Chu, P., Wu, E., & Weiss, L. M. (2000). Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol*, 13(9), 962-972.
- Chu, P. G., & Weiss, L. M. (2002). Expression of cytokeratin 5/6 in epithelial neoplasms: an immunohistochemical study of 509 cases. *Mod Pathol*, 15(1), 6-10.
- Clark, B. R., & Todd, C. W. (1982). Avidin as a precipitant for biotin-labeled antibody in a radioimmunoassay for carcinoembryonic antigen. *Anal Biochem*, 121(2), 257-262.

- Coons, A. H. (1958). Fluorescent antibody methods. *Gen Cytochem Methods*, 1, 399-422.
- Coons, A. H., Leduc, E. H., & Connolly, J. M. (1955). Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J Exp Med*, 102(1), 49-60.
- Cordell, J. L., Falini, B., Erber, W. N., Ghosh, A. K., Abdulaziz, Z., MacDonald, S., . . . Mason, D. Y. (1984). Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem*, 32(2), 219-229.
- Corey, G. R., Campbell, P. T., Van Trigt, P., Kenney, R. T., O'Connor, C. M., Sheikh, K. H., . . . Wall, T. C. (1993). Etiology of large pericardial effusions. *Am J Med*, 95(2), 209-213.
- Cuijpers, V. M., Boerman, O. C., Salet van de Pol, M. R., Vooijs, G. P., Poels, L. G., & Ramaekers, F. C. (1993). Immunocytochemical detection of ovarian carcinoma cells in serous effusions. *Acta Cytol*, 37(3), 272-279.
- Dalquen, P. (1986). [Immunocytochemical cytodagnostic of tumors]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 70, 205-210.
- Dalquen, P., Sauter, G., Epper, R., Kleiber, B., Feichter, G., & Gudat, F. (1993). Immunocytochemistry in diagnostic cytology. *Recent Results Cancer Res*, 133, 47-80.
- Dannenber, K., P. (2015). *Treffsicherheit der Perikardergusszytologie*. (Med. Diss.), Heinrich Heine Universität Düsseldorf.
- Davis, S., Rambotti, P., & Grignani, F. (1984). Intrapericardial tetracycline sclerosis in the treatment of malignant pericardial effusion: an analysis of thirty-three cases. *J Clin Oncol*, 2(6), 631-636.
- De Angelis, M., Buley, I. D., Heryet, A., & Gray, W. (1992). Immunocytochemical staining of serous effusions with the monoclonal antibody Ber-EP4. *Cytopathology*, 3(2), 111-117.
- De Mey, J., Moeremans, M., Geuens, G., Nuydens, R., & De Brabander, M. (1981). High resolution light and electron microscopic localization of tubulin with the IGS (immuno gold staining) method. *Cell Biol Int Rep*, 5(9), 889-899.
- DeCamp, M. M., Jr., Mentzer, S. J., Swanson, S. J., & Sugarbaker, D. J. (1997). Malignant effusive disease of the pleura and pericardium. *Chest*, 112(4 Suppl), 291S-295S.
- Dequanter, D., Lothaire, P., Berghmans, T., & Sculier, J. P. (2008). Severe pericardial effusion in patients with concurrent malignancy: a retrospective analysis of prognostic factors influencing survival. *Ann Surg Oncol*, 15(11), 3268-3271.
- DeYoung, B. R., & Wick, M. R. (2000). Immunohistologic evaluation of metastatic carcinomas of unknown origin: an algorithmic approach. *Semin Diagn Pathol*, 17(3), 184-193.
- Dietrich, C. F., Nürnberg, D. (2011). *Interventioneller Ultraschall* (Vol. 1. Auflage). Stuttgart: Thieme.
- Dogliani, C., Dei Tos, A. P., Laurino, L., Iuzzolino, P., Chiarelli, C., Celio, M. R., & Viale, G. (1996). Calretinin: a novel immunocytochemical marker for mesothelioma. *Am J Surg Pathol*, 20(9), 1037-1046.
- Dragoescu, E. A., & Liu, L. (2013). Pericardial fluid cytology: an analysis of 128 specimens over a 6-year period. *Cancer Cytopathol*, 121(5), 242-251.

- Duffy, M. J., Bonfrer, J. M., Kulpa, J., Rustin, G. J., Soletormos, G., Torre, G. C., . . . Zwirner, M. (2005). CA125 in ovarian cancer: European Group on Tumor Markers guidelines for clinical use. *Int J Gynecol Cancer*, 15(5), 679-691.
- Erdmann, E. (2007). *Klinische Kardiologie* (Vol. 7. Auflage). Heidelberg: Springer.
- Erdmann, E. (2011). *Klinische Kardiologie* (Vol. 8. Auflage). Heidelberg: Springer.
- Faulk, W. P., & Taylor, G. M. (1971). An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*, 8(11), 1081-1083.
- Fernandes, F., Ianni, B. M., Arteaga, E., Benvenuti, L., & Mady, C. (1998). [Value of pericardial biopsy in the etiologic diagnosis of pericardial diseases]. *Arq Bras Cardiol*, 70(6), 393-395.
- Fiala, W., & Schneider, J. (1982). [Heart metastasis of malignant tumors. An autopsy study]. *Schweiz Med Wochenschr*, 112(43), 1497-1501.
- Flannery, E. P., Gregoratos, G., & Corder, M. P. (1975). Pericardial effusions in patients with malignant diseases. *Arch Intern Med*, 135(7), 976-977.
- Freudenberg, N., Kortsik, C., & Ross, A. (2002). *Grundlagen der Zytopathologie*. Basel u.a: Karger.
- Friedman, M. J., Sahn, D. J., & Haber, K. (1979). Two-dimensional echocardiography and B-mode ultrasonography for the diagnosis of loculated pericardial effusion. *Circulation*, 60(7), 1644-1649.
- Garcia-Riego, A., Cuinas, C., & Vilanova, J. J. (2001). Malignant pericardial effusion. *Acta Cytol*, 45(4), 561-566.
- Geisinger, K. (2004). *Modern cytopathology*. Philadelphia, Pa.: Churchill Livingstone.
- Giorno, R. (1984). A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn Immunol*, 2(3), 161-166.
- Giorno, R., & Kohler, P. F. (1983). Immunohistological localization of human lymphocyte subsets. *Diagn Immunol*, 1(1), 17-26.
- Goldman, B. S., & Pearson, F. G. (1965). Malignant Pericardial Effusion. Review of Hospital Experience and Report of a Case Successfully Treated by Talc Poudrage. *Can J Surg*, 8, 157-161.
- Goldstein, N. S., Bassi, D., & Uzieblo, A. (2001). WT1 is an integral component of an antibody panel to distinguish pancreaticobiliary and some ovarian epithelial neoplasms. *Am J Clin Pathol*, 116(2), 246-252.
- Goldstein, N. S., Long, A., Kuan, S. F., & Hart, J. (2000). Colon signet ring cell adenocarcinoma: immunohistochemical characterization and comparison with gastric and typical colon adenocarcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 8(3), 183-188.
- Gornik, H. L., Gerhard-Herman, M., & Beckman, J. A. (2005). Abnormal cytology predicts poor prognosis in cancer patients with pericardial effusion. *J Clin Oncol*, 23(22), 5211-5216.
- Goudie, R. B. (1955). Secondary tumours of the heart and pericardium. *Br Heart J*, 17(2), 183-188.
- Gould, V. E., Wiedenmann, B., Lee, I., Schwechheimer, K., Dockhorn-Dworniczak, B., Radosevich, J. A., . . . Franke, W. W. (1987). Synaptophysin expression in neuroendocrine neoplasms as determined by immunocytochemistry. *Am J Pathol*, 126(2), 243-257.

- Gouny, P., Lancelin, C., Girard, P. M., Hocquet-Cheynel, C., Rozenbaum, W., & Nussaume, O. (1998). Pericardial effusion and AIDS: benefits of surgical drainage. *Eur J Cardiothorac Surg*, 13(2), 165-169.
- Graham, R. C., Jr., Lundholm, U., & Karnovsky, M. J. (1965). Cytochemical Demonstration of Peroxidase Activity with 3-Amino-9-Ethylcarbazole. *J Histochem Cytochem*, 13, 150-152.
- Green, N. M. (1963). Avidin. 1. The Use of (14-C)Biotin for Kinetic Studies and for Assay. *Biochem J*, 89, 585-591.
- Guberman, B. A., Fowler, N. O., Engel, P. J., Gueron, M., & Allen, J. M. (1981). Cardiac tamponade in medical patients. *Circulation*, 64(3), 633-640.
- Guzman, J., Bross, K. J., & Costabel, U. (1990). Malignant pleural effusions due to small cell carcinoma of the lung. An immunocytochemical cell-surface analysis of lymphocytes and tumor cells. *Acta Cytol*, 34(4), 497-501.
- Guzman, J., Costabel, U., Bross, K. J., Grunert, F., Wiehle, U., von Kleist, S., & Schaefer, H. E. (1988). [Immunocytochemistry of pleural effusion in breast carcinoma using the adhesive slide assay]. *Prax Klin Pneumol*, 42 Suppl 1, 377-379.
- Guzman, J., Hilgarth, M., Bross, K. J., Ross, A., Wiehle, U., Kresin, V., . . . von Kleist, S. (1988). Malignant ascites of serous papillary ovarian adenocarcinoma. An immunocytochemical study of the tumor cells. *Acta Cytol*, 32(4), 519-522.
- Gyr, N. E. (2003). *Internistische Notfälle : sicher durch die Akutsituation und die nachfolgenden 48 Stunden ; 128 Tabellen* (Vol. 7. Auflage). Stuttgart: Thieme.
- Halfdanarson, T. R., Hogan, W. J., & Moynihan, T. J. (2006). Oncologic emergencies: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*, 81(6), 835-848.
- Hancock, E. W. (1990). Neoplastic pericardial disease. *Cardiol Clin*, 8(4), 673-682.
- Harries, S. R., Fox, B. M., & Roobottom, C. A. (1998). Azygos reflux: a CT sign of cardiac tamponade. *Clin Radiol*, 53(9), 702-704.
- Haskell, R. J., & French, W. J. (1985). Cardiac tamponade as the initial presentation of malignancy. *Chest*, 88(1), 70-73.
- Hastka, J. (1997). *Immunzytologie*. Stuttgart: Schattauer.
- Heinonen, P. K., Tontti, K., Koivula, T., & Pystynen, P. (1985). Tumour-associated antigen CA 125 in patients with ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol*, 92(5), 528-531.
- Hilgers, R.-D., Bauer, P., Scheiber, V. (2007). *Einführung in die Medizinische Statistik* (Vol. 2. Auflage). Heidelberg: Springer.
- Holt, J. P. (1970). The normal pericardium. *Am J Cardiol*, 26(5), 455-465.
- Holt, J. P., Rhode, E. A., & Kines, H. (1960). Pericardial and ventricular pressure. *Circ Res*, 8, 1171-1181.
- Hombach, V. (2009). *Kardiovaskuläre Magnetresonanztomographie : Atlas und DVD ; mit 28 Tab.* Stuttgart: Schattauer.
- Hossfeld, D. K., Gatzemeier, U. (1988). *Maligne Ergüsse*. Basel: Karger.
- Hsu, S. M., & Raine, L. (1981). Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 29(11), 1349-1353.
- Hsu, S. M., Raine, L., & Fanger, H. (1981a). A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol*, 75(5), 734-738.

- Hsu, S. M., Raine, L., & Fanger, H. (1981b). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29(4), 577-580.
- Imazio, M., Mayosi, B. M., Brucato, A., Markel, G., Trincherio, R., Spodick, D. H., & Adler, Y. (2010). Triage and management of pericardial effusion. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 11(12), 928-935.
- Jambhekar, N. A., Chaturvedi, A. C., & Madur, B. P. (2008). Immunohistochemistry in surgical pathology practice: a current perspective of a simple, powerful, yet complex, tool. *Indian J Pathol Microbiol*, 51(1), 2-11.
- Jang, K. Y., Kang, M. J., Lee, D. G., & Chung, M. J. (2001). Utility of thyroid transcription factor-1 and cytokeratin 7 and 20 immunostaining in the identification of origin in malignant effusions. *Anal Quant Cytol Histol*, 23(6), 400-404.
- Jeong, T. D., Jang, S., Park, C. J., & Chi, H. S. (2012). Prognostic relevance of pericardial effusion in patients with malignant diseases. *Korean J Hematol*, 47(3), 237-238.
- Jiang, B., Wu, G. P., Zhao, Y. J., & Wang, S. C. (2008). Transcription expression and clinical significance of TTF-1 mRNA in pleural effusion of patients with lung cancer. *Diagn Cytopathol*, 36(12), 849-854.
- Joppien, S., Maier, S. L., Wendling, D.S. (2011). *Experimentelle Doktorarbeit* (Vol. 1. Auflage). München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Karatolios, K., & Maisch, B. (2007). [Pericardiocentesis]. *Dtsch Med Wochenschr*, 132(33), 1707-1710.
- Karatolios, K., Maisch, B., & Pankuweit, S. (2011). [Tumor markers in the assessment of malignant and benign pericardial effusion]. *Herz*, 36(4), 290-295.
- Kaufmann, O., & Dietel, M. (2000). Thyroid transcription factor-1 is the superior immunohistochemical marker for pulmonary adenocarcinomas and large cell carcinomas compared to surfactant proteins A and B. *Histopathology*, 36(1), 8-16.
- Kaufmann, O., Fietze, E., & Dietel, M. (2002). [Immunohistochemical diagnosis in cancer metastasis of unknown primary tumor]. *Pathologe*, 23(3), 183-197.
- Keen, C. E., Szakacs, S., Okon, E., Rubin, J. S., & Bryant, B. M. (1999). CA125 and thyroglobulin staining in papillary carcinomas of thyroid and ovarian origin is not completely specific for site of origin. *Histopathology*, 34(2), 113-117.
- Kim, S. H., Kwak, M. H., Park, S., Kim, H. J., Lee, H. S., Kim, M. S., . . . Lee, J. S. (2010). Clinical characteristics of malignant pericardial effusion associated with recurrence and survival. *Cancer Res Treat*, 42(4), 210-216.
- Klöppel, G., Bubendorf, L., Feichter, G. E., Obermann, E. C., Dalquen, P., Kloppel, G., . . . Remmele, W. (2011). *Pathologie*.
- Koelma, I. A., Nap, M., Rodenburg, C. J., & Fleuren, G. J. (1987). The value of tumour marker CA 125 in surgical pathology. *Histopathology*, 11(3), 287-294.
- Koss, L. G., Melamed, M. R. (2006). *Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases* (Vol. 5. Auflage). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kotte, J. H., & McGuire, J. (1951). Pericardial paracentesis. *Mod Concepts Cardiovasc Dis*, 20(7), 102-103.
- Krikorian, J. G., & Hancock, E. W. (1978). Pericardiocentesis. *Am J Med*, 65(5), 808-814.
- Kristjansdottir, B., Levan, K., Partheen, K., & Sundfeldt, K. (2013). Diagnostic performance of the biomarkers HE4 and CA125 in type I and type II epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 131(1), 52-58.

- Krüger, R., de Leon, F., & Maihoff, J. (1992). Der Wert der Immunhistochemie in der histologischen Routinediagnostik von Metastasen unbekannter Primärtumoren. *Pathologie*, 13(2), 65-72.
- Kutalek, S. P., Panidis, I. P., Kotler, M. N., Mintz, G. S., Carver, J., & Ross, J. J. (1985). Metastatic tumors of the heart detected by two-dimensional echocardiography. *Am Heart J*, 109(2), 343-349.
- Kwan, T., Karve, M. M., & Emerole, O. (1993). Cardiac tamponade in patients infected with HIV. A report from an inner-city hospital. *Chest*, 104(4), 1059-1062.
- Lagendijk, J. H., Mullink, H., Van Diest, P. J., Meijer, G. A., & Meijer, C. J. (1998). Tracing the origin of adenocarcinomas with unknown primary using immunohistochemistry: differential diagnosis between colonic and ovarian carcinomas as primary sites. *Hum Pathol*, 29(5), 491-497.
- Lam, K. Y., Dickens, P., & Chan, A. C. (1993). Tumors of the heart. A 20-year experience with a review of 12,485 consecutive autopsies. *Arch Pathol Lab Med*, 117(10), 1027-1031.
- Lau, S. K., Luthringer, D. J., & Eisen, R. N. (2002). Thyroid transcription factor-1: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 10(2), 97-102.
- Leader, M., Collins, M., Patel, J., & Henry, K. (1987). Vimentin: an evaluation of its role as a tumour marker. *Histopathology*, 11(1), 63-72.
- Leake, J., Woolas, R. P., Daniel, J., Oram, D. H., & Brown, C. L. (1994). Immunocytochemical and serological expression of CA 125: a clinicopathological study of 40 malignant ovarian epithelial tumours. *Histopathology*, 24(1), 57-64.
- Lee, J. S., Nam, J. H., Lee, M. C., Park, C. S., & Juhng, S. W. (1996). Immunohistochemical panel for distinguishing between carcinoma and reactive mesothelial cells in serious effusions. *Acta Cytol*, 40(4), 631-636.
- Leff, A., Hopewell, P. C., & Costello, J. (1978). Pleural effusion from malignancy. *Ann Intern Med*, 88(4), 532-537.
- Levy, P. Y., Corey, R., Berger, P., Habib, G., Bonnet, J. L., Levy, S., . . . Raoult, D. (2003). Etiologic diagnosis of 204 pericardial effusions. *Medicine (Baltimore)*, 82(6), 385-391.
- Light, R. W. (1997). Diagnostic principles in pleural disease. *Eur Respir J*, 10(2), 476-481.
- Lockwood, W. B., & Broghamer, W. L., Jr. (1980). The changing prevalence of secondary cardiac neoplasms as related to cancer therapy. *Cancer*, 45(10), 2659-2662.
- Loy, T. S., Quesenberry, J. T., & Sharp, S. C. (1992). Distribution of CA 125 in adenocarcinomas. An immunohistochemical study of 481 cases. *Am J Clin Pathol*, 98(2), 175-179.
- Maisch, B., Ristic, A., & Pankuweit, S. (2010). Evaluation and management of pericardial effusion in patients with neoplastic disease. *Prog Cardiovasc Dis*, 53(2), 157-163.
- Maisch, B., Seferovic, P. M., Ristic, A. D., Erbel, R., Rienmuller, R., Adler, Y., . . . Management of Pericardial Diseases of the European Society of, C. (2004). Guidelines on the diagnosis and management of pericardial diseases executive summary; The Task force on the diagnosis and management of pericardial diseases of the European society of cardiology. *Eur Heart J*, 25(7), 587-610.

- Malamou-Mitsi, V. D., Zioga, A. P., & Agnantis, N. J. (1996). Diagnostic accuracy of pericardial fluid cytology: an analysis of 53 specimens from 44 consecutive patients. *Diagn Cytopathol*, 15(3), 197-204.
- Mason, D. Y., & Sammons, R. E. (1979). The labeled antigen method of immunoenzymatic staining. *J Histochem Cytochem*, 27(4), 832-840.
- Mason, M. R., Bedrossian, C. W., & Fahey, C. A. (1987). Value of immunocytochemistry in the study of malignant effusions. *Diagn Cytopathol*, 3(3), 215-221.
- Mason, T. E., Phifer, R. F., Spicer, S. S., Swallow, R. A., & Dreskin, R. B. (1969). An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens. *J Histochem Cytochem*, 17(9), 563-569.
- Matter-Walstra, K. W., & Kraft, R. (1996). Atypical cells in effusions: diagnostic value of cell image analysis combined with immunocytochemistry. *Diagn Cytopathol*, 15(4), 263-269.
- McKenna, R. J., Jr., Ali, M. K., Ewer, M. S., & Frazier, O. H. (1985). Pleural and pericardial effusions in cancer patients. *Curr Probl Cancer*, 9(6), 1-44.
- Merce, J., Sagrista-Sauleda, J., Permanyer-Miralda, G., & Soler-Soler, J. (1998). Should pericardial drainage be performed routinely in patients who have a large pericardial effusion without tamponade? *Am J Med*, 105(2), 106-109.
- Mewis, C. (2004). *Kardiologie compact : alles für Station und Facharztprüfung ; 189 Tabellen* (Vol. 1. Auflage). Stuttgart: Thieme.
- Meyers, D. G., & Bouska, D. J. (1989). Diagnostic usefulness of pericardial fluid cytology. *Chest*, 95(5), 1142-1143.
- Meyers, D. G., Meyers, R. E., & Prendergast, T. W. (1997). The usefulness of diagnostic tests on pericardial fluid. *Chest*, 111(5), 1213-1221.
- Miettinen, M., & Sarlomo-Rikala, M. (2003). Expression of calretinin, thrombomodulin, keratin 5, and mesothelin in lung carcinomas of different types: an immunohistochemical analysis of 596 tumors in comparison with epithelioid mesotheliomas of the pleura. *Am J Surg Pathol*, 27(2), 150-158.
- Miller, A. J. (1970). Some observations concerning pericardial effusions and their relationship to the venous and lymphatic circulation of the heart. *Lymphology*, 3(2), 76-78.
- Miller, A. J., Jain, S., & Levin, B. (1971). Radiographic visualization of lymphatic drainage of heart muscle and pericardial sac in the dog. *Chest*, 59(3), 271-275.
- Miller, A. J., Pick, R., & Johnson, P. J. (1971). The production of acute pericardial effusion: the effects of various degrees of interference with venous blood and lymph drainage from the heart muscle in the dog. *Am J Cardiol*, 28(4), 463-466.
- Moldenhauer, G., Momburg, F., Moller, P., Schwartz, R., & Hammerling, G. J. (1987). Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. *Br J Cancer*, 56(6), 714-721.
- Moll K. J., M. M. (2006). *Anatomie: Kurzlehrbuch* (Vol. 18. Auflage). München: Urban & Fischer Elsevier.
- Moll, R., Dhouailly, D., & Sun, T. T. (1989). Expression of keratin 5 as a distinctive feature of epithelial and biphasic mesotheliomas. An immunohistochemical study using monoclonal antibody AE14. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 58(2), 129-145.
- Moskaluk, C. A., Zhang, H., Powell, S. M., Cerilli, L. A., Hampton, G. M., & Frierson, H. F., Jr. (2003). Cdx2 protein expression in normal and malignant human tissues:

- an immunohistochemical survey using tissue microarrays. *Mod Pathol*, 16(9), 913-919.
- Motherby, H. (1999). Adjuvante Untersuchungsmethoden zur Verbesserung der Treffsicherheit der Ergusszytologie. Habilitationsschrift der Medizinischen Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Motherby, H., Friedrichs, N., Kube, M., Nadjari, B., Knops, K., Donner, A., . . . Böcking, A. (1999). Immunocytochemistry and DNA-image cytometry in diagnostic effusion cytology. II. Diagnostic accuracy in equivocal smears. *Anal Cell Pathol*, 19(2), 59-66.
- Motherby, H., Kube, M., Friedrichs, N., Nadjari, B., Knops, K., Donner, A., . . . Böcking, A. (1999). Immunocytochemistry and DNA-image cytometry in diagnostic effusion cytology I. Prevalence of markers in tumour cell positive and negative smears. *Anal Cell Pathol*, 19(1), 7-20.
- Motherby, H., Nadjari, B., Friegel, P., Kohaus, J., Ramp, U., & Böcking, A. (1999). Diagnostic accuracy of effusion cytology. *Diagn Cytopathol*, 20(6), 350-357.
- Nakamura, N., Miyagi, E., Murata, S., Kawaoi, A., & Katoh, R. (2002). Expression of thyroid transcription factor-1 in normal and neoplastic lung tissues. *Mod Pathol*, 15(10), 1058-1067.
- Nakane, P. K., & Kawaoi, A. (1974). Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem*, 22(12), 1084-1091.
- Nap, M. (1998). Immunohistochemistry of CA 125 - Unusual expression in normal tissues, distribution in the human fetus and questions around its application in diagnostic pathology. *International Journal of Biological Markers*, 13(4), 210-215.
- Oates, J., & Edwards, C. (2000). HBME-1, MOC-31, WT1 and calretinin: an assessment of recently described markers for mesothelioma and adenocarcinoma. *Histopathology*, 36(4), 341-347.
- Ogmundsdottir, H. M., Gudlaugsdottir, S., Bjornsson, J., & Jonasdottir, S. (1996). Altered expression of CA-125 in breast carcinomas. *APMIS*, 104(1), 47-53.
- Olayioye, M. A. (2001). Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res*, 3(6), 385-389.
- Ordonez, N. G. (1998). Value of cytokeratin 5/6 immunostaining in distinguishing epithelial mesothelioma of the pleura from lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*, 22(10), 1215-1221.
- Ordonez, N. G. (2000a). Thyroid transcription factor-1 is a marker of lung and thyroid carcinomas. *Adv Anat Pathol*, 7(2), 123-127.
- Ordonez, N. G. (2000b). Value of thyroid transcription factor-1, E-cadherin, BG8, WT1, and CD44S immunostaining in distinguishing epithelial pleural mesothelioma from pulmonary and nonpulmonary adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*, 24(4), 598-606.
- Ordonez, N. G. (2002). Immunohistochemical diagnosis of epithelioid mesotheliomas: a critical review of old markers, new markers. *Hum Pathol*, 33(10), 953-967.
- Ordonez, N. G., Shen, S. S., Zenali, M., & Deavers, M. T. (2013). Melan A (A103) is not a marker of mesothelioma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 21(2), 181-184.

- Ore, R. M., Reed, B. G., & Leath, C. A., 3rd. (2013). Malignant pericardial effusion and pericardial tumor involvement secondary to cervical cancer. *Mil Med*, 178(1), e130-132.
- Permanyer-Miralda, G., Sagrista-Sauleda, J., & Soler-Soler, J. (1985). Primary acute pericardial disease: a prospective series of 231 consecutive patients. *Am J Cardiol*, 56(10), 623-630.
- Pinto, M. M. (1986). Malignant pericardial effusion and cardiac tamponade. *Acta Cytol*, 30(6), 657-661.
- Pomjanski, N., Grote, H. J., Doganay, P., Schmiemann, V., Buckstegge, B., & Böcking, A. (2005). Immunocytochemical identification of carcinomas of unknown primary in serous effusions. *Diagn Cytopathol*, 33(5), 309-315.
- Pomjanski, N., Motherby, H., Buckstegge, B., Knops, K., Rohn, B. L., & Böcking, A. (2001). Early diagnosis of mesothelioma in serous effusions using AgNOR analysis. *Anal Quant Cytol Histol*, 23(2), 151-160.
- Posner, M. R., Cohen, G. I., & Skarin, A. T. (1981). Pericardial disease in patients with cancer. The differentiation of malignant from idiopathic and radiation-induced pericarditis. *Am J Med*, 71(3), 407-413.
- Press, O. W., & Livingston, R. (1987). Management of malignant pericardial effusion and tamponade. *JAMA*, 257(8), 1088-1092.
- Prichard, R. W. (1951). Tumors of the heart; review of the subject and report of 150 cases. *AMA Arch Pathol*, 51(1), 98-128.
- Pu, R. T., Pang, Y., & Michael, C. W. (2008). Utility of WT-1, p63, MOC31, mesothelin, and cytokeratin (K903 and CK5/6) immunostains in differentiating adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, and malignant mesothelioma in effusions. *Diagn Cytopathol*, 36(1), 20-25.
- Rajiah, P. (2011). Cardiac MRI: Part 2, pericardial diseases. *AJR Am J Roentgenol*, 197(4), W621-634.
- Rashed, A., Vigh, A., Alotti, N., & Simon, J. (2007). [The etiology, differential diagnosis and therapy of pericardial effusion]. *Orv Hetil*, 148(33), 1551-1555.
- Refaat, M. M., & Katz, W. E. (2011). Neoplastic pericardial effusion. *Clin Cardiol*, 34(10), 593-598.
- Reis-Filho, J. S., Carrilho, C., Valenti, C., Leitao, D., Ribeiro, C. A., Ribeiro, S. G., & Schmitt, F. C. (2000). Is TTF1 a good immunohistochemical marker to distinguish primary from metastatic lung adenocarcinomas? *Pathol Res Pract*, 196(12), 835-840.
- Remmele, W., & Stegner, H. E. (1987). [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, 8(3), 138-140.
- Reyes, C. V., Strinden, C., & Banerji, M. (1982). The role of cytology in neoplastic cardiac tamponade. *Acta Cytol*, 26(3), 299-302.
- Reynen, K. (1995a). Cardiac myxomas. *N Engl J Med*, 333(24), 1610-1617.
- Reynen, K. (1995b). [Metastatic heart tumors]. *Dtsch Med Wochenschr*, 120(38), 1290-1295.
- Reynen, K. (1996). Frequency of primary tumors of the heart. *Am J Cardiol*, 77(1), 107.
- Reynen, K., Kockeritz, U., & Strasser, R. H. (2004). Metastases to the heart. *Ann Oncol*, 15(3), 375-381.

- Ristic, A. D., Seferovic, P. M., & Maisch, B. (2005). Management of pericardial effusion the role of echocardiography in establishing the indications and the selection of the approach for drainage. *Herz*, 30(2), 144-150.
- Rodriguez de Castro, F., Molero, T., Acosta, O., Julia-Serda, G., Caminero, J., Cabrera, P., & Carrillo, T. (1994). Value of DNA analysis in addition to cytological testing in the diagnosis of malignant pleural effusions. *Thorax*, 49(7), 692-694.
- Rubin, B. P., Skarin, A. T., Pisick, E., Rizk, M., & Salgia, R. (2001). Use of cytokeratins 7 and 20 in determining the origin of metastatic carcinoma of unknown primary, with special emphasis on lung cancer. *Eur J Cancer Prev*, 10(1), 77-82.
- Saito, Y., Donohue, A., Attai, S., Vahdat, A., Brar, R., Handapangoda, I., & Chandraratna, P. A. (2008). The syndrome of cardiac tamponade with "small" pericardial effusion. *Echocardiography*, 25(3), 321-327.
- Salamon, P., Berliner, S., Shachner, A., & Pinkhas, J. (1989). Tetracycline treatment for malignant pericardial effusion. *Med Interne*, 27(1), 73-74.
- Schwechheimer, K., & Zhou, L. (1995). HMB45: a specific marker for melanoma metastases in the central nervous system? *Virchows Arch*, 426(4), 351-353.
- Seeber, S., Schütte, J. (2007). *Therapiekonzepte Onkologie* (Vol. 5. Auflage). Heidelberg: Springer.
- Shabetai, R., Mangiardi, L., Bhargava, V., Ross, J., Jr., & Higgins, C. B. (1979). The pericardium and cardiac function. *Prog Cardiovasc Dis*, 22(2), 107-134.
- Sheibani, K., Shin, S. S., Kezirian, J., & Weiss, L. M. (1991). Ber-EP4 antibody as a discriminant in the differential diagnosis of malignant mesothelioma versus adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*, 15(8), 779-784.
- Shidham, V. B., & Atkinson, B. F. (2007). *Cytopathologic Diagnosis of Serous Fluids*.
- Shield, P. W., Callan, J. J., & Devine, P. L. (1994). Markers for metastatic adenocarcinoma in serous effusion specimens. *Diagn Cytopathol*, 11(3), 237-245.
- Shimizu, M., Toki, T., Takagi, Y., Konishi, I., & Fujii, S. (2000). Immunohistochemical detection of the Wilms' tumor gene (WT1) in epithelial ovarian tumors. *Int J Gynecol Pathol*, 19(2), 158-163.
- Shin, J. H., Bae, J. H., Lee, A., Jung, C. K., Yim, H. W., Park, J. S., & Lee, K. Y. (2010). CK7, CK20, CDX2 and MUC2 Immunohistochemical staining used to distinguish metastatic colorectal carcinoma involving ovary from primary ovarian mucinous adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol*, 40(3), 208-213.
- Silverman, J. F., Nance, K., Phillips, B., & Norris, H. T. (1987). The use of immunoperoxidase panels for the cytologic diagnosis of malignancy in serous effusions. *Diagn Cytopathol*, 3(2), 134-140.
- Smith, C. (1986). Tumors of the heart. *Arch Pathol Lab Med*, 110(5), 371-374.
- Sobin, L. H., & Compton, C. C. (2010). TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer*, 116(22), 5336-5339.
- Spehn, J., Iwanetz, S., & Schmitz-Huebner, U. (1995). [The immunocytochemical study of pleural effusion and ascites using Ber-EP-4 antibodies]. *Dtsch Med Wochenschr*, 120(36), 1197-1200.
- Spriggs, A., Boddington, MM. (1989). *Atlas of Serous Fluid Cytopathology. A Guide to the Cells of the Pleural, Pericardial, Peritoneal and Hydrocele Fluids*. (G. Gresham Ed. Vol. 14). Kluwer: Dordrecht.

- Statistisches-Bundesamt. (2012). Todesursachen in Deutschland 2011. *Fachserie 12*.
- Sternberger, L. A., Hardy, P. H., Jr., Cuculis, J. J., & Meyer, H. G. (1970). The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem*, 18(5), 315-333.
- Stopyra, G. A., Warhol, M. J., & Mulhaupt, H. A. (2001). Utility of CK7 and CK20 immunohistochemistry in the detection of synchronous breast and colon carcinoma in a pleural effusion: a case report and supporting survey of archival material. *Diagn Cytopathol*, 25(1), 54-58.
- Streefkerk, J. G. (1972). Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. *J Histochem Cytochem*, 20(10), 829-831.
- Su, Y. C., Hsu, Y. C., & Chai, C. Y. (2006). Role of TTF-1, CK20, and CK7 immunohistochemistry for diagnosis of primary and secondary lung adenocarcinoma. *Kaohsiung J Med Sci*, 22(1), 14-19.
- Talreja, D. R., Nishimura, R. A., Oh, J. K., & Holmes, D. R. (2008). Constrictive pericarditis in the modern era: novel criteria for diagnosis in the cardiac catheterization laboratory. *J Am Coll Cardiol*, 51(3), 315-319.
- Tanaka, S., Saito, K., Ito, T., Tajima, K., Mogi, A., Shitara, Y., . . . Kuwano, H. (2007). CDX2 as a useful marker of colorectal adenocarcinoma metastases to lung in pre-operative biopsy specimens. *Oncol Rep*, 18(1), 87-92.
- Thümmler, F., Schmidt, H., & Evequoz, D. (1999). Der Perikarderguss in der Klinik Diagnose und Therapie. [Pericardial effusion in the hospital-diagnosis and therapy]. *Praxis (Bern 1994)*, 88(39), 1573-1580.
- Topalak, O., Saygili, U., Soy Turk, M., Karaca, N., Batur, Y., Uslu, T., & Erten, O. (2002). Serum, pleural effusion, and ascites CA-125 levels in ovarian cancer and nonovarian benign and malignant diseases: a comparative study. *Gynecol Oncol*, 85(1), 108-113.
- Tot, T. (1999a). Adenocarcinomas metastatic to the liver: the value of cytokeratins 20 and 7 in the search for unknown primary tumors. *Cancer*, 85(1), 171-177.
- Tot, T. (1999b). Patterns of distribution of cytokeratins 20 and 7 in special types of invasive breast carcinoma: a study of 123 cases. *Ann Diagn Pathol*, 3(6), 350-356.
- Tsang, T. S., El-Najdawi, E. K., Seward, J. B., Hagler, D. J., Freeman, W. K., & O'Leary, P. W. (1998). Percutaneous echocardiographically guided pericardiocentesis in pediatric patients: evaluation of safety and efficacy. *J Am Soc Echocardiogr*, 11(11), 1072-1077.
- Tsang, T. S., Enriquez-Sarano, M., Freeman, W. K., Barnes, M. E., Sinak, L. J., Gersh, B. J., . . . Seward, J. B. (2002). Consecutive 1127 therapeutic echocardiographically guided pericardiocenteses: clinical profile, practice patterns, and outcomes spanning 21 years. *Mayo Clin Proc*, 77(5), 429-436.
- Vaitkus, P. T., Herrmann, H. C., & LeWinter, M. M. (1994). Treatment of malignant pericardial effusion. *JAMA*, 272(1), 59-64.
- Van Haam, E. (1977). *Cytology of Transudates and Exsudates*. Basel: Karger.

- Vayre, F., Lardoux, H., Chikli, F., Pezzano, M., Bourdarias, J. P., Koukoui, F., . . . Dubourg, O. (1998). [Evaluation of echo-guided pericardiocentesis in cardiac tamponade]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 91(1), 13-20.
- Warnke, R., & Levy, R. (1980). Detection of T and B cell antigens hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish peroxidase method. *J Histochem Cytochem*, 28(8), 771-776.
- Wiener, H. G., Kristensen, I. B., Haubek, A., Kristensen, B., & Baandrup, U. (1991). The diagnostic value of pericardial cytology. An analysis of 95 cases. *Acta Cytol*, 35(2), 149-153.
- Wilkes, J. D., Fidias, P., Vaickus, L., & Perez, R. P. (1995). Malignancy-related pericardial effusion. 127 cases from the Roswell Park Cancer Institute. *Cancer*, 76(8), 1377-1387.
- Wong, B., Murphy, J., Chang, C. J., Hassenein, K., & Dunn, M. (1979). The risk of pericardiocentesis. *Am J Cardiol*, 44(6), 1110-1114.
- Yaziji, H., Battifora, H., Barry, T. S., Hwang, H. C., Bacchi, C. E., McIntosh, M. W., . . . Gown, A. M. (2006). Evaluation of 12 antibodies for distinguishing epithelioid mesothelioma from adenocarcinoma: identification of a three-antibody immunohistochemical panel with maximal sensitivity and specificity. *Mod Pathol*, 19(4), 514-523.
- Young, J. M., & Goldman, I. R. (1954). Tumor metastasis to the heart. *Circulation*, 9(2), 220-229.
- Zhu, W., & Michael, C. W. (2007). WT1, monoclonal CEA, TTF1, and CA125 antibodies in the differential diagnosis of lung, breast, and ovarian adenocarcinomas in serous effusions. *Diagn Cytopathol*, 35(6), 370-375.
- Zipf, R. E., Jr., & Johnston, W. W. (1972). The role of cytology in the evaluation of pericardial effusions. *Chest*, 62(5), 593-596.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verteilung der Häufigkeiten bezogen auf das Perikard hinsichtlich Transsudate, Exsudate sowie neoplastischen Ergüssen (Van Haam, 1977).

Abb. 2: Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs (n=76).

Abb. 3: Einteilung der Patienten nach Altersklassen und Geschlecht.

Abb. 4: Färbeautomat am Schwerpunkt für Cytopathologie für automatisierte und standardisierte zytologische Färbungen.

Abb. 5: Präparationsschema zur Herstellung von Ausstrichpräparaten seröser Perikardergüsse für eine zytologische und immunzytochemische Untersuchung am Schwerpunkt für Cytopathologie.

Abb. 6: Gutartiger Perikarderguss, MGG-Färbung, 400-fach vergrößert.

Abb. 7: Maligner Perikarderguss, MGG-Färbung, 400-fache Vergrößerung.

Abb. 8: Verstärkungsprinzip der Avidin-Biotin Methode Darstellung modifiziert nach (Hastka, 1997).

Abb. 9: ABC-Technik. Darstellung modifiziert nach Joppien (2011) und Hastka (1997).

Abb. 10: Diagnostischer Interpretationsalgorithmus für Perikardergüsse bezogen auf Adenokarzinome. Modifiziert nach (Pomjanski et al., 2005). (+)= „positiv“, (-) = „negativ“; im Vergleich zweier Marker stärkere (>) bzw. (<) schwächere Expression.

Abb. 11: Maligner Perikarderguss, TTF-1 „positiv“, 400-fach vergrößert.

Abb. 12: Maligner Perikarderguss, CK 7 „positiv“, 400-fach vergrößert.

Abb. 13: Aufklärungsrate bezogen auf die Patientenzahl.

Abb. 14: Darstellung des gesamten Patientenkollektivs unter Berücksichtigung der Parallelstudie von Dannenberg (2015).

Abb. 15: Zytologische Befunde des vorliegenden Präparate-Kollektivs (n=76).

Abb. 16: Geschlechterspezifischer Unterschied benigner und maligner Ergüsse.

Abb. 17: Geschlechtsspezifische Verteilung der Ätiologie benigner Perikardergüsse.

Abb. 18: Geschlechterverteilung der „tumorzell-positiven“ Ergüsse. %: Prozent

Abb. 19: Geschlechtsspezifische Verteilung nach Herkunftsorgan der „tumorzell-positiven“ Perikardergüsse.

Abb. 20: Nachbetrachtung von Probe 3, hämorrhagischer Erguss, MGG-Färbung, 400-fach vergrößert.

Abb. 21: Immunzytochemische Nachuntersuchung von Probe 6, BerEP4 positiv, Papanicolaou-Färbung, 400-fach vergrößert.

Abb. 22: Darstellung der Treffsicherheit der Tumortypisierung in Subkohorte 2 (n=47).

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ätiologie der Ergüsse seröser Körperhöhlen, modifiziert nach (Abdallah & Atar, 2014; Böcking et al., 2000).

Tabelle 2: Relative Häufigkeit verschiedener Symptome bei Patienten mit malignem Perikarderguss (Hossfeld, 1988).

Tabelle 3: Klinische Symptome einer Herztamponade (Guberman, Fowler, Engel, Gueron, & Allen, 1981).

Tabelle 4: Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik der Ergüsse seröser Körperhöhlen, modifiziert nach (Böcking et al., 2000).

Tabelle 5: Schema der Färbung nach May-Grünwald-Giemsa am Schwerpunkt für Cytopathologie der Uniklinik Düsseldorf.

Tabelle 6: Schema der Färbung nach Papanicolaou am Schwerpunkt für Cytopathologie der Uniklinik Düsseldorf.

Tabelle 7: Immunzytochemisches Färbeprotokoll des Instituts für Cytopathologie Universitätsklinik Düsseldorf.

Tabelle 8: Spezifikationen der Antikörper, die im Rahmen der vorliegenden Studie am Schwerpunkt für Cytopathologie Düsseldorf am häufigsten benutzt worden sind (Art, Verdünnung, Hersteller/Spezifität von Primär-Antikörpern und Lokalisation des Färbeergebnisses).

Tabelle 9: Ergebnismatrix von Testinterpretationen in der Medizin. Modifiziert nach Hilgers (2007). Diagnostik +/-: Diagnose maligne/benigne; Tumor +/-: Tumor maligne/benigne.

Tabelle 10: Aufteilung der *Follow-Up*-Daten von von Wertungskategorie 1 nach Evidenzlevel.

Tabelle 11: Statistische Verteilung der „tumorzell-negativen“ Perikardergüsse nach Ätiologie bei Männern und Frauen.

Tabelle 12: Statistische Verteilung der „tumorzell-positiven“ Perikardergüsse nach Ätiologie bei Männern und Frauen.

Tabelle 13: Statistische Verteilung der Perikardergüsse nach Ätiologie bei Männern und Frauen.

Tabelle 14: Markeranwendung in der Subkohorte1.

Tabelle 15: Datenverteilung von zytologischen Befunden und immunzytochemischen Anwendungen zum Tumorzellnachweis (Subkohorte 1, n = 29).

Tabelle 16: Verteilung der absoluten Häufigkeiten der konventionell-zytologischen Untersuchungen zum Tumornachweis in Wertungskategorie 1.

Tabelle 17: Verteilung der absoluten Häufigkeiten immunzytochemischer Untersuchungen zum Tumornachweis in Wertungskategorie 1.

Tabelle 18: Gegenüberstellung der Treffsicherheit von zytologischer Diagnostik ohne adjuvante Methoden und mit adjuvanten Methoden an Perikardergüssen in Wertungskategorie 1 (n=30).

Tabelle 19: Verteilung der absoluten Häufigkeiten immunzytochemischer Untersuchungen an zytologisch „zweifelhaften“ Fällen in der Wertungskategorie 1.

Tabelle 20: Verteilung der Häufigkeiten der konventionell-zytologischen Untersuchungen zum Tumornachweis (Wertungskategorie 2).

Tabelle 21: Gegenüberstellung der Treffsicherheit von zytologischer Diagnostik ohne adjuvante Methoden und mit adjuvanten Methoden an Perikardergüssen in Wertungskategorie 2 (n=29).

Tabelle 22: Darstellung der nachträglichen Untersuchungen des 1. Patientenfalls.

Tabelle 23: Darstellung der nachträglichen Untersuchungen des 2. Patientenfalls.

Tabelle 24: Immunzytochemische Korrelation zum zugrunde liegenden *Primarius*.

Tabelle 25: Darstellung der tatsächlichen Diagnose und des Färbeergebnisses im Kollektiv der falschen Typisierungen.

Tabelle 26: Anzahl der Fälle mit positiver Immunreaktion und dem arithmetischen Score für die am häufigsten angewandten Marker bezogen auf die 3 häufigsten *Primarii* der Subkohorte 2 (n=47).

Tabelle 27: Studien zur diagnostischen Treffsicherheit der konventionellen Perikardergusszytologie.

Tabelle 28: Gegenüberstellung der Treffsicherheit von zytologischer Diagnostik ohne adjuvante Methoden und mit adjuvanten Methoden an Perikardergüssen (n=29) .

Tabelle 29: Studien zur diagnostischen Aussagekraft adjuvanter Ergusszytologie.

Tabelle 30: Ätiologie der Ergüsse seröser Körperhöhlen (Motherby, 1999), modifiziert nach Böcking (Böcking et al., 2000).

Tabelle 31: Studien zur diagnostischen Treffsicherheit der Typisierung.

Tabelle 32 : Detektion des *Primarius* durch Markerkonstellationen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Wegbegleitern bedanken, die mich während meines Studiums und meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld, Leiter des Schwerpunkts Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die Überlassung der interessanten Themenstellung dieser Arbeit. Die engagierte, professionelle und vor allem sehr freundliche Betreuung und Zusammenarbeit haben zum Fortschritt und Gelingen dieser Dissertation in jeder Phase sehr beigetragen. Sein kompetenter und warmherziger Rat kam mir in zahlreichen Situationen zugute.

Außerdem geht mein herzlicher Dank an Dr. Martin Schramm für seine Anregungen und Ideen, ohne ihn wären die mikroskopischen Aufnahmen nicht möglich gewesen.

Ferner möchte ich mich auch bei dem gesamten Team des Schwerpunkts Cytopathologie bedanken, jeder hat auf seine Weise – stets mit offenen Ohren und großer Hilfsbereitschaft - meine Arbeit unterstützt.

Herrn Prof. Dr. med. Malte Kelm danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Meiner Familie danke ich für viele ermutigende Worte und stete Unterstützung, sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Kristina Haastert

Unterschrift