

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Irene Esposito
- Funktionsbereich Cytopathologie -

Zytopathologische Untersuchungen am Liquor cerebrospinalis:
Möglichkeiten und Grenzen

Dissertation

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

vorgelegt von

Elvedin Djedovic

2018

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. S. Biesterfeld

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. U. Germing

Für meine Familie

Zusammenfassung

Die Liquorzytologie nimmt im klinischen Alltag eine wichtige Rolle in der Diagnostik von Patienten mit neurologischer Symptomatik ein. Dies gilt vor allem in der Beurteilung maligner Erkrankungen, bei deren Annahme eine zytologische Befundung die Verdachtsdiagnose einer Meningeosis carcinomatosa bestätigen oder entkräften soll. Leider gibt es relativ wenige Studien in der Fachliteratur, die Aussagen über die Treffsicherheit zytologischer Liquoruntersuchungen machen. Ziel dieser Studie war es daher, die Treffsicherheit der Liquorzytologie am eigenen Krankengut des Funktionsbereichs Cytopathologie der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf zu überprüfen und die Aussagekraft dieser diagnostischen Methode aktuell zu beurteilen. Darüber hinaus sollten die Limitationen der liquorzytologischen Diagnostik in Bezug auf die klinische Diagnostik analysiert werden.

Die Liquordiagnosen von 179 Patienten aus den Jahren 2008 und 2009 wurden re-evaluiert und den klinischen Enddiagnosen aus dem Follow-Up gegenübergestellt. Es zeigte sich eine Gesamttreffsicherheit von 51,4% bei einer Spezifität von 100% und einer Sensitivität von 23,7%. Der positive Prädiktionswert belief sich auf 100%, der negative Prädiktionswert auf 42,8%. Es lässt sich somit schlussfolgern, dass positive zytologische Befunde mit hoher Sicherheit einen Liquorbefall durch einen malignen Tumor anzeigen, während nur ein Teil der Fälle von malignen Tumoren mit klinisch angenommener Liquorbeteiligung erkannt werden können.

Als mögliche Ursachen für die im Vergleich zu anderen zytologischen Anwendungen gefundene niedrige Sensitivität in der Tumordiagnostik können im Kontext mit der aktuellen wissenschaftlichen Literatur zusammenwirkende Aspekte der Zellpräparation, der Zellbeurteilung und der klinischen Diagnostik gelten. Relativ selten kann die Liquorzytologie eine sichere Hilfestellung bei der Zuordnung von chronisch-entzündlichen Zellbildern geben. Inwieweit aktuelle Methoden der Molekularpathologie bzw. die Verwendung von Liquor nach Art einer *liquid biopsy* diese Körperflüssigkeit als Diagnostikum weiter aufwerten können, wird sich in den nächsten Jahren zeigen. Aus der weiteren Entwicklung sind diese zukunftsweisenden Methoden jedenfalls nicht wegzudenken.

Abstract

The cerebrospinal fluid (CSF) cytology plays an important role in daily clinical practice on patients with neurological symptoms. Especially in the cytological confirmation or falsification of suspected meningeosis carcinomatosa. Unfortunately there is only a scarce number of studies in literature about the diagnostic accuracy of CSF cytology. Therefore the aim of this study was to assess the diagnostic accuracy and the significance of CSF cytology. For this purpose we reviewed clinical cases from the department of Pathology / Cytopathology of the Heinrich-Heine-University hospital. Additionally the limitations of the CSF cytology were analyzed in relation to clinical diagnostics.

Cerebrospinal fluid diagnoses of 179 patients from the years 2008 and 2009 were reevaluated and compared with the clinical diagnoses from follow-up examinations. Overall accuracy was 51,4 % while we reached a sensitivity of 23,7 % and a specificity of 100 %. The positive predictive value was 100 % and the negative predictive value was 42,8 %. We concluded that a positive cytologic result shows CSF involvement of malignant diseases with a high certainty, whereas only a part of the overall tumors which were clinically suspected to have CSF involvement, could be detected by cytology.

The possible underlying causes for the low sensitivity of CSF cytology found in comparison to other cytologic methods in tumor diagnostic, could be the interacting aspects of cell preparation, cell assessment and clinical diagnostic in context of the current literature. The CSF is very rarely of use when it comes to assess inflammatory cell conditions. How far the status of CSF as a diagnostic medium can be raised by novel methods like molecular pathology or the use of liquid biopsy will be shown in the upcoming years. Nevertheless in further scientific development, those methods should play an important and trendsetting role.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AWMF	Arbeitsgemeinschaft wissenschaftlich-medizinischer Fachgesellschaften
B	Präfix für eine Subpopulation lymphatischer Zellen ("B-Zellen")
B-CLL	B-Zell-differenzierte chronische lymphatische Leukämie
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD163	Immunhistochemischer Antikörper
CD20	Immunhistochemischer Antikörper
CD3	Immunhistochemischer Antikörper
CD79a	Immunhistochemischer Antikörper
CDR	<i>complementarity-determining region</i>
CML	Chronische myeloische Leukämie
CNS	<i>central nervous system</i> , Zentralnervensystem
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i> , Liquor
CT	Computertomographie
DGLN	Deutsche Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie e.V.
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dV	dringender Verdacht
EFNS	<i>European Federation of Neurological Sciences</i>
EL	Evidenzlevel
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i> , immunhistochemischer Antikörper
ESA	<i>epithelial specific antigen</i> , immunhistochemischer Antikörper

G	Gesamttreffsicherheit
GATA-3	nach der DNA-Sequenz G-A-T-A benannter immunhistochemischer Antikörper
GFAP	<i>Glial fibre acid protein</i> , saures Gliafaserprotein, immunhistochemischer Antikörper
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEA-125	Immunhistochemischer Antikörper
HIV	Human immunodeficiency virus
Hrsg.	Herausgeber
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IgA	Immunglobulin der Gruppe A
IgG	Immunglobulin der Gruppe G
IgM	Immunglobulin der Gruppe M
kt	kein Tumor
l	Liter
M.	Morbus
mal.	malignes
MALT	<i>mucosa associated lymphatic tissue</i>
MDS	myelodysplastisches Syndrom
Melan-A	Immunhistochemischer Antikörper
MGG	May-Grünwald-Giemsa(-Färbung), konventionelle Sonderfärbung in der Mikroskopie
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MNC	<i>mononuclear cells</i> (Lymphozyten und Monozyten)
MOC-31	Immunhistochemischer Antikörper
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Variable für "Zahl" (z.B. von Fällen)
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NPV	<i>negative predictive value</i> , negativer Prädiktionswert

PAS	konventionelle Sonderfärbung in der Mikroskopie
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PNC	<i>polymorphic nuclear cells</i> (Granulozyten)
POEMS	Akronym für ein klinisches Syndrom mit den Merkmalen <i>polyneuropathy</i> , <i>organomegaly</i> , <i>endocrinopathy</i> , <i>myeloma protein</i> , und <i>skin changes</i> , hier paraneoplastisches Syndrom bei Plasmazellerkrankungen
PPV	<i>positive predictive value</i> , positiver Prädiktionswert
RAEB II	<i>refractive anemia with excess of blasts, type II</i> , Form des myelodysplastischen Syndroms
S1	Qualitätsmerkmal einer Leitlinie der AWMF (Stufen: S1, S2k, S2e, S3)
S-100	Immunhistochemischer Antikörper
SAB	Subarachnoidalblutung
SOP	<i>standard operating procedure</i> , Standardvorgehensweise im Labor
T	Tumor
T	Präfix für eine Subpopulation lymphatischer Zellen ("T-Zellen")
Tab.	Tabelle
TTF-1	<i>Thyroid transcription factor 1</i> , immunhistochemischer Antikörper
U / min.	Umdrehungszahl pro Minute (hier: von Zentrifugen)
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
vgl.	vergleiche
VZV	Varizellen-Zoster-Virus
WHO	<i>World Health Organization</i>
x	-fach; z.B. 40-fache Vergrößerung (40x)
ZNS	Zentralnervensystem
zw	zweifelhaft
Σ	mathematisches Summenzeichen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Anatomie und Physiologie des Liquorsystems	1
1.3	Untersuchungsmethoden von Liquorproben	4
1.4	Liquorzytologie als Standbein in der Ausbreitungsdiagnostik maligner Tumoren	5
1.4.1	Indikationsstellung und Durchführung der Liquorpunktion	6
1.4.2	Liquorverarbeitung für die zytologische Untersuchung	8
1.4.3	Zelluläre Zusammensetzung eines normalen Liquor cerebrospinalis	9
1.4.4	Zellbilder entzündlicher Erkrankungen im Liquor cerebrospinalis	10
1.4.5	Zellbilder neoplastischer Erkrankungen im Liquor cerebrospinalis	13
1.5	Diagnostische Aussagekraft der Liquorzytologie	17
1.6	Problemstellung	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Fallkollektiv	21
2.1.1	Patientenauswahl	21
2.1.2	Geschlechterverteilung	22
2.1.3	Altersverteilung	22
2.2	Materialgewinnung und Präparation	24
2.2.1	Herstellung der Präparate	24
2.3	Zytodiagnostik	25
2.3.1	Mikroskopische Untersuchung der Präparate	25
2.3.2	Schriftliche Befunderstellung	27
2.4	Statistik	28
2.4.1	Grundlagen der statistischen Auswertung	28
2.4.2	Kenndaten der statistischen Auswertung	29
2.4.3	Definition der Evidenzlevel	30

3	Ergebnisse	34
3.1	Studienaufbau	34
3.2	Kategorien liquorzytologischer Befunde	35
3.2.1	"Tumorzell-negative" Fälle	36
3.2.2	"Zweifelhafte" Fälle	36
3.2.3	"Dringend verdächtige" Fälle	36
3.2.4	"Tumorzell-positive" Fälle	36
3.3	Statistische Auswertung	37
3.3.1	Kenndaten zur klinischen und zytologischen Diagnostik	37
3.3.2	Auswertung nach Evidenzleveln	38
3.3.3	Klinische Diagnoseeinteilung	40
3.3.4	Kategorisierung und Ursachen der definitiven Diagnosen	41
3.3.4.1	Nicht maligne Diagnosen	41
3.3.4.2	Maligne Diagnosen	44
4	Diskussion	48
4.1	Liquorzytologie in der Tumordiagnostik: Eine Methode mit hoher Spezifität und eingeschränkter Sensitivität	48
4.2	Einflussgrößen auf die Treffsicherheit der Liquorzytologie: <i>sampling error</i> , <i>screening error</i> und <i>clinical error</i>	50
4.3	Erwartungswerte an die Treffsicherheit der Liquorzytologie bei epithelialen Tumoren	54
4.4	Erwartungswerte an die Treffsicherheit der Liquorzytologie von malignen Lymphomen und Leukämien	58
4.5	Beurteilung eigener Ergebnisse in der Tumordiagnostik	60
4.6	Adjuvante Methoden in der liquorzytologischen Tumordiagnostik	66
4.7	Liquordiagnostik nicht-neoplastischer Erkrankungen	69
4.8	Ausblick	71
5	Literaturverzeichnis	73

1 Einleitung

1.1 Einführung

Untersuchungen an Punktaten des Liquor cerebrospinalis stellen einen wichtigen Grundpfeiler der neurologischen Diagnostik dar. Sie lassen sich grob in mikrobiologische, virologische, laborchemische und morphologische Anwendungen gliedern, mit denen man von verschiedenen Seiten aus an die konkrete klinische Fragestellung des Einzelfalles herantritt.

Der Liquorzytologie als morphologischem Verfahren kommt dabei die Beurteilung des Zellbildes zu, insbesondere zur Objektivierung von entzündlichen Reaktionen und zum Nachweis von Tumorzellen. Erstdiagnosen, Verlaufskontrollen, aber vor allem auch akute Fragestellungen werden teilweise erst mit Hilfe der Zytologie zu einer endgültigen klinischen Diagnose gebracht. Vorgenommen werden die zytologischen Untersuchungen überwiegend in Instituten für Pathologie bzw. Neuropathologie. Manche Kliniken für Hämatologie und Onkologie führen neben der dort üblichen Knochenmarkzytologie auch die Liquorzytologie, gerade bei hämatologischen Fragestellungen nach einem Lymphom- oder Leukämieinfiltrat, selber durch.

Wenn man sich mit pathologischen Veränderungen befassen möchte, ist es wichtig, auch das Normale zu kennen und zu bedenken. Daher sollen im Folgenden einige Grundlagen zu Anatomie und Physiologie des Liquors vorgestellt werden.

1.2 Anatomie und Physiologie des Liquorsystems

Der normale Liquor cerebrospinalis ist eine klare zellarme Flüssigkeit. Sie umspült innerhalb der Hirnhäute Gehirn und Rückenmark und bietet somit mechanischen Schutz. Des Weiteren dient er als Puffersystem und als Transportsystem für Botenstoffe und Nährstoffe. Er spielt eine wichtige Rolle im Immunsystem und bei der Elimination von Metaboliten und Abbauprodukten (Matsumae et al., 2016).

Das gesamte Zentralnervensystem (ZNS) wird von drei Schichten unterschiedlicher Hirnhäute umschlossen. Die äußere Schicht ist die Dura mater, welche ein periostales und ein meningeales Blatt aufweist. Die beiden Duraschichten ragen stellenweise auseinander und bilden die venösen Abflüsse des Gehirns, die Sinus durae matris. Unterhalb des meningealen Blattes der Dura mater befindet sich die Arachnoidea, die durch eine Zellschicht aus *tight junctions* (Neurothel) von der Dura abgegrenzt wird. Ausgehend von der Arachnoidea ragen die sogenannten Arachnoidalzotten (Pacchionische Granulationen) in die Sinus durae matris. Weiter zerebral anschließend befindet sich die Pia mater, welche dem Hirnparenchym direkt aufliegt und den Gyri cerebri auch in die Tiefe anliegend folgt. An Bereichen, an denen der Abstand zwischen Gehirn und Schädelinnerem größer wird, weichen die beiden inneren Meningen weiter auseinander und bilden intrakranielle Zisternen, und zwar die Cisterna interpeduncularis, die Cisterna cerebellomedullaris, die Cisterna pontis, die Cisterna chiasmatis, die Cisterna corporis callosi, die Cisterna ambiens und die Cisterna lateralis. Die Zisternen stellen somit die voluminöseren Areale des Subarachnoidalraumes dar. Die Cisterna cerebellomedullaris nimmt dabei eine Sonderstellung ein, da sie den Zugangspunkt für die selten durchgeführte Subokzipitalpunktion darstellt. Das Gesamtvolumen des Liquors beträgt im Durchschnitt etwa 150-170 ml und ist verteilt auf die Kompartimente der inneren und äußeren Liquorräume. Diese werden durch das Ventrikelsystem als inneres und die Subarachnoidalräume als äußeres Kompartiment repräsentiert. Hauptproduktionsort des Liquors sind die Zellen des Plexus choroideus, die bis zu 90% der Gesamtmenge sezernieren. Der restliche Liquor wird von den nicht fenestrierten Gefäßen des Gehirns produziert sowie vom mit dem Liquorkompartiment kommunizierenden Hirnparenchym (Zettl et al., 2005).

Der Großteil des Volumens (ca. 125 ml) befindet sich in den Subarachnoidalräumen, während im Ventrikelsystem nur etwa 25 ml vorzufinden sind. Die Tagesproduktion an Liquor beträgt ca. 500 ml und bedeutet somit eine etwa viermalige tägliche Neuproduktion (Sakka et al., 2011).

Das Ventrikelsystem (Abb. 1) besteht aus den paarigen Ventrikeln 1 und 2, welche sich frontooccipital erstrecken und kaudal in den unpaarigen dritten Ventrikel auf Höhe des

Thalamus übergehen. Dieser ist über den Aquaeductus mesencephali mit dem vierten Ventrikel verbunden, welcher im Rückenmark weiter als Canalis centralis verläuft, wo er blind endet. Er stellt über das dorsal liegende Foramen Monroi und die Foramina Luschkae die Verbindung zu den äußeren Liquorräumen dar (Zetl et al., 2005).

Die Subarachnoidalräume werden durch die beiden inneren Hirnhäute Arachnoidea und Pia mater gebildet und von Trabekeln durchsetzt, die sich von der kranial liegenden Arachnoidea zur Pia mater erstrecken. Der Abfluss bzw. die Resorption des Liquors aus diesen Räumen ist derzeit in Fachkreisen Gegenstand vieler Diskussionen. Der bisher angenommene klassische Resorptionsweg über die Pacchionischen Granulationen scheint in dem bisher angenommenen Umfang nicht vollständig akzeptabel zu sein, da in einigen Studien neue Resorptionswege nachgewiesen worden sind. Durch experimentelle Daten wird angenommen, dass Nervenscheiden cranialer und spinaler Nerven, die Adventitia von Hirnarterien sowie die Lamina cribrosa des Os ethmoidale einen maßgeblichen Anteil an der Drainage des Liquors haben (Sakka et al., 2011). Ebenfalls wird das bisher angenommene Bild der unidirektionalen Liquorzirkulation in Frage gestellt und durch die Theorie einer pulsatilen Vor- und Rückbewegung ersetzt (Brinker et al., 2014).

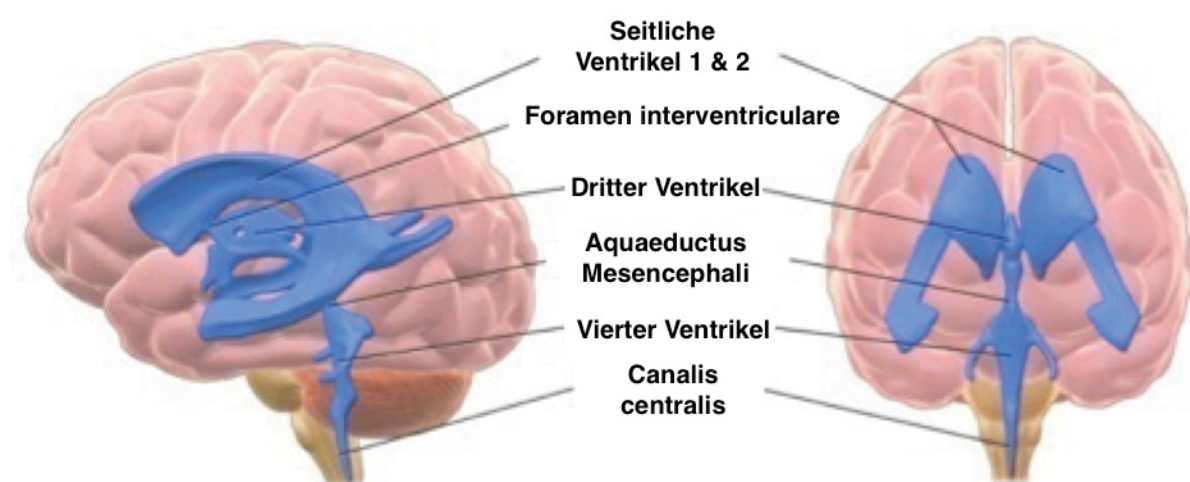


Abb. 1: Ventrikelsystem in Front und Seitenansicht (überarbeitet nach "Blausen 0896 Ventricles of the Brain" von Bruce Blaus. Lizenz: [CC BY 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/))

1.3 Untersuchungsmethoden von Liquorproben

Der übliche Untersuchungsumfang an Liquorproben ist heutzutage in verbindlichen Leitlinien und Empfehlungen zusammengefasst.

Als Beispiel aus dem deutschsprachigen Raum kann dabei auf die Vorgaben der „Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie e.V. in der Deutschen Gesellschaft für Neurologie“ verwiesen werden, die unter dem Titel „Leitlinien der Liquordiagnostik und Methodenkatalog der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie“ (Petereit et al., 2007) vorliegen. Im Kapitel „Notfall- und Grundprogramm der Liquordiagnostik“ werden folgende Untersuchungen und Bestimmungen genannt:

- Visuelle Beurteilung der Liquorprobe
- Zellzahl im Liquor
- Zelldifferenzierung [= Liquorzytologie]
- Erreger-Schnell-Nachweis
- Gesamtprotein
- Lactat
- Albumin und IgG
- IgA und IgM
- Oligoklonales IgG

Ergänzt werden können diese Basisuntersuchungen durch Anwendungen, die im Kapitel „Spezialuntersuchungen mit gesicherter oder ergänzender diagnostischer Bedeutung“ spezifiziert sind. Dabei werden im Unterkapitel „Zell- und Erregerdiagnostik“ folgende Themen angesprochen:

- Immunzytologie maligner Zellen [= Immunzytochemie]
- CDR-spezifische Analyse der B-Zell-Klonalität
- Aktivierte B-Lymphozyten
- Lymphozytensubpopulationen
- Liquorzellcharakterisierung mit Durchflusszytometrie

- Errerger-spezifische Antikörper in Liquor und Serum (IgG-Klasse)
- Nachweis von erregerspezifischen Nukleinsäuren durch PCR-Verfahren

Die drei weiteren Unterkapitel zu den Spezialuntersuchungen, die hier nicht vertieft werden sollen, beziehen sich auf Proteindiagnostik, Autoantikörperdiagnostik sowie auf die Diagnostik von Stoffwechselfparametern und Enzymen.

Eine Anpassung an die klinischen Gegebenheiten jedes einzelnen Falles wird dabei nicht immer sinnvoll sein. Andererseits ist in den Leitlinien auch ein Kapitel mit dem Titel „Empfehlungen zur diagnoseorientierten Auswahl von Untersuchungsmethoden in der Liquordiagnostik“ eingefügt, mit dem man bestimmten fallbezogenen Gegebenheiten schon zu Beginn der Diagnostik Rechnung tragen kann (Petereit et al., 2007).

Die Zytopathologie ist somit nicht die einzige Richtung in der Medizin, die sich mit dem Liquor befasst. In Abhängigkeit vom klinisch-neurologischen Bild werden Untersuchungen im klinischen Zentrallabor oder in Abteilungen für Medizinische Mikrobiologie bzw. Virologie zu erbringen sein, sodass Liquorproben dann in mehrere Aliquots aufgeteilt werden.

1.4 Liquorzytologie als Standbein in der Ausbreitungsdiagnostik maligner Tumoren

Die Methoden der Liquorzytologie, die Gegenstand dieser Arbeit ist, haben eine lange Entwicklungsgeschichte hinter sich. Diese folgen jedoch trotz immer fortlaufender bisheriger Entwicklungen auch Traditionen. Sie basieren bis heute auf der konventionellen mikroskopischen Untersuchung des Zellbildes, ergänzt um adjuvante Methoden. Dazu gehören insbesondere die Immunzytochemie und molekulare Verfahren, aber auch die Durchflusszytometrie (Kluge et al., 2005).

In vielen klinischen Fällen wird dabei deutlich, wie verknüpft und gegenseitig abhängig die Gebiete der Neurologie und der Zytologie in der Diagnosefindung sind. Dies liegt darin begründet, dass eine definitive Erkenntnis in der Liquordiagnostik nicht nur aus dem Ergebnis des zytopathologischen Gutachtens gewonnen wird, sondern aus dem

Zusammenspiel der Beurteilung mit den Ergebnissen der neurologischen Untersuchungen sowie der bildgebenden Verfahren.

Dabei muss bedacht werden, dass von den Tumorpatienten, die tumorverdächtige neurologische Ausfälle erleiden, nur knapp 20% eine Meningeosis carcinomatosa aufweisen; als Inzidenz bezogen auf alle Tumorpatienten werden Werte von 4% - 15% für Karzinome, 5% - 15% für Leukämien und Lymphome bzw. 1% - 2 % für Primärtumoren des ZNS angegeben (Chamberlain 1997).

Ca. 5% - 10% der Fälle einer Meningeosis carcinomatosa entsprechen einer Erstmanifestation eines Malignoms (Chamberlain 2005). In den meisten Fällen hingegen (60% - 70%) kommt es erst in einem fortgeschrittenen Stadium der malignen Erkrankung zu einer Meningeose (Balm und Hammack, 1996, Wasserström et al., 1982).

In der vorliegenden Arbeit soll anhand der retrospektiven Auswertung einer repräsentativen Probenzahl ein Überblick über die Möglichkeiten und die Aussagekraft der Liquorzytologie für ein Patientenkollektiv mit einem Schwerpunkt auf der Tumordiagnostik erstellt werden. Außerdem soll eine Übersicht darüber geboten werden, welche Möglichkeiten der heutige Entwicklungsstand der Zytologie bietet und wie adjuvante morphologische Methoden zur klinischen Diagnosefindung beitragen können.

1.4.1 Indikationsstellung und Durchführung der Liquorpunktion

Wesentliche aktuelle Vorgaben zu diesem Thema sind in der S1-Leitlinie „Diagnostische Liquorpunktion“ der Deutschen Gesellschaft für Neurologie aus dem Jahr 2012 zusammengestellt (Diener und Weimar, 2012).

Die Liquorentnahme ist ein Vorgang, der gewisse Risiken mit sich bringt, weshalb die Indikationen und Kontraindikationen gut abgewogen werden müssen. Der klassische Weg der Liquorentnahme ist die Lumbalpunktion, die bei genauer Einhaltung entsprechender Regeln als eher risikoarm gilt. Sie wurde schon 1891 von Quincke eingeführt und stellt bis heute den häufigsten Weg zur Liquorgewinnung dar. Andere

Methoden sind die laterale Zervikalpunktion oder die Okzipitalpunktion, welche aufgrund eines höheren Komplikationsrisikos eher selten durchgeführt werden. Die Liquorgewinnung kann auch mittels einer Ventrikelpunktion erfolgen, die oft im Kontext einer Ventrikeldrainage wird oder bei Anlegen eines Ommaya-Reservoirs durchgeführt werden kann. Im klinischen Alltag herrscht jedoch die Lumbalpunktion vor. Diese wird meist am liegenden Patienten durchgeführt. Der Patient liegt optimaler Weise in Seitenlage mit leicht gekrümmtem Oberkörper und ermöglicht damit, etwas mehr Raum zwischen den angepeilten Wirbelkörpern zu schaffen. Unter sterilen Verhältnissen wird die Punktionsnadel zwischen dem 4. und dem 5. Lendenwirbelkörper eingeführt, wobei der Arzt bei der Entnahme das Eindringen in den Subarachnoidalraum in Form eines Widerstandes beim Durchdringen der Dura mater deutlich spürt. Zu diagnostischen Zwecken sollte aufgrund diverser Untersuchungsverfahren ausreichend Liquor gewonnen werden (Zettl et al., 2005). Um ein Liquorverlust-Syndrom zu vermeiden, werden jedoch meist nur kleinere Mengen entnommen. Nach den Leitlinien der „Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und klinische Neurochemie“ ist im Regelfall eine Entnahme von nur 3 ml angesetzt und bei umfangreicher Differentialdiagnostik eine Entnahme von bis zu 15 ml möglich (Petereit et al. 2007). Laut Konsensusprotokoll zur Standardisierung von Entnahme und Biobanking des Liquor cerebrospinalis wiederum (Teunissen et al., 2009) sollte eine Mindestmenge von 12 ml entnommen werden. Nach Glantz ist die Entnahme von mindestens 10,5 ml Liquor einer der Faktoren, welche die Treffsicherheit der Liquorzytologie erhöhen (Glantz et al., 1998). Selbst diese Menge, welche unterhalb der beiden erstgenannten liegt, ist nur selten im klinischen Alltag vorzufinden und wurde in unserem Patientengut in aller Regel nicht erreicht.

Der bei Liquorentnahme zu befürchtende postpunktionelle Kopfschmerz korreliert laut Kuntz et al. (1992) nicht mit der Entnahmemenge des Liquors. Grant et al. zeigten stattdessen, dass die Entnahme von Liquor auch bei kleineren Mengen zu postpunktionellem Kopfschmerz führen kann und dass es eine Beziehung zwischen Lumbalpunktion und postpunktionellem Kopfschmerz gibt (Grant et al., 1991).

Kontraindikationen zur Lumbalpunktion ergeben sich aus limitierenden Faktoren außerhalb oder innerhalb des Liquorsystems. Diese sind in den Leitlinien der DGLN im

Kapitel „Diagnostische Liquorpunktion“ definiert. Ein erhöhter intrakranieller Druck ist eine der wichtigsten Kontraindikationen. Kommt es durch die Lumbalpunktion zu einer Druckentlastung, so besteht die Gefahr einer Einklemmung vitaler Strukturen. Von einer Punktion muss ebenfalls abgesehen werden, wenn beim Patienten eine Blutungsneigung vorliegt.

Besteht eine oberflächliche oder tiefe Entzündung an der Entnahmestelle ob an der Haut oder dem darunterliegenden Gewebe, so ist die Lumbalpunktion dort kontraindiziert (Diener und Weimar, 2012). In diesen Fällen ist dann eine Subokzipitalpunktion über die Cisterna cerebellomedullaris zu erwägen (Schwab et al., 2015).

1.4.2 Liquorverarbeitung für die zytologische Untersuchung

Für den Zytologen ist es für eine sichere Diagnose unabdingbare Voraussetzung, in ausreichender Zahl morphologisch gut beurteilbare Zellen auf den Präparaten vorzufinden. Diese Voraussetzung muss durch die vorbereitenden Maßnahmen der Liquorzytologie bestmöglich erfüllt werden, sodass die Zellausbeute nicht nur quantitativ, sondern durch möglichst schonende Verarbeitung auch qualitativ hochwertig ausfallen kann. Zur Zellgewinnung stehen diverse, aktuell in einer Arbeit von Dahlmann et al. (2017) in den historischen Kontext eingeordnete Möglichkeiten zur Verfügung wie beispielsweise die lange verwendete Spontansedimentation nach Sayk (1954), die Filtermethode nach Seal (1956) oder später auch Zentrifugationsmethoden (Hansen, 1969). Die Präferenz darüber, welche Methode zur Anwendung kommt, war aber je nach Lehrmeinung und vor allem aber abhängig von der Erfahrung des Zytologen unterschiedlich (Bigner und Johnston, 1983; Rosenthal, 1984). In einer Studie von Ducos et al. (1979) stellte sich dann heraus, dass selbst die Zellausbeute der Standardzentrifugation ähnliche Resultate liefert wie das Sedimentationsverfahren. Mit der technischen Entwicklung moderner Zentrifugen konnte gezeigt werden, dass deren Verwendung eine bessere Zellkonzentration im Punktat ermöglicht (Potemkowski et al., 1995). Heute sind vorwiegend moderne Zytozentrifugationsverfahren im Einsatz (Dahlmann et al. 2017). Dabei können konventionelle zytologische Präparate hergestellt werden; andererseits sind aber auch Dünnschicht-basierte Zellpräparationsverfahren

am Liquor möglich und führen zu technisch guten und gut auswertbaren Präparaten (Pan et al. 2015).

Unabhängig davon, welche Methode zur Zellanreicherung und Präparatherstellung verwendet wird, sollte diese möglichst schnell nach Liquorentnahme vorgenommen werden. Das Zeitlimit hierbei beträgt ca. 1-2 Stunden (Torzewski et al., 2008), da nach dieser Zeit die Autolyse der enthaltenen Zellen unkontrollierbar wird und die Morphologie erheblich leidet. Die Fixierung der Zellen auf den Objektträgern wird meist durch Lufttrocknung erreicht, danach erfolgt die Färbung mit einer der Standardfärbungen der Pathologie.

In den meisten Fällen wird die MGG-Färbung (May-Grünwald-Giemsa) angewandt. Möglich sind nach Nachfixation in Formalin oder Alkohol aber auch andere konventionelle Färbungen wie die HE- und die Papanicolaou-Färbung, die manche vor allem bei Tumorverdacht bevorzugen und die ggfls. auch um immunzytochemische Sonderfärbungen ergänzt werden könnten. Eine Gram-Färbung kann bei Verdacht auf bakterielle Meningitis zum Einsatz kommen.

1.4.3 Zelluläre Zusammensetzung eines normalen Liquor cerebrospinalis

Die Grundlage der zytologischen Beurteilung ist das Wissen über die Zusammensetzung des normalen Liquors sowie Kenntnisse über die durch die Präparation verursachten Zellveränderungen, um Fehlinterpretationen zu vermeiden. Ein lumbal entnommener unauffälliger Liquor enthält in der Regel nur sehr wenige Lymphozyten und Monozyten und kann sogar zellfrei sein. Andererseits ist es möglich, dass Ependymzellen zu finden sind. Außerdem können Zellen aus dem Punktionsweg vorkommen, insbesondere Chondrozyten, Erythrozyten oder Zellen aus dem Knochenmark. Auch Plattenepithelien aus der Epidermis oder quergestreifte Muskelzellen sind denkbar. Artifiziiell punktierte Erythrozyten können dem Liquorzytologen bei der Beurteilung als Größenmaßstab nützlich sein (Zettl et al., 2005).

1.4.4 Zellbilder entzündlicher Erkrankungen im Liquor cerebrospinalis

Akut entzündliche Zellbilder

Das Zellbild bei akuten entzündlichen Erkrankungen ist in den allermeisten Fällen eindeutig von granulozytärer Besiedelung der Liquorräume geprägt (Abb. 2)¹

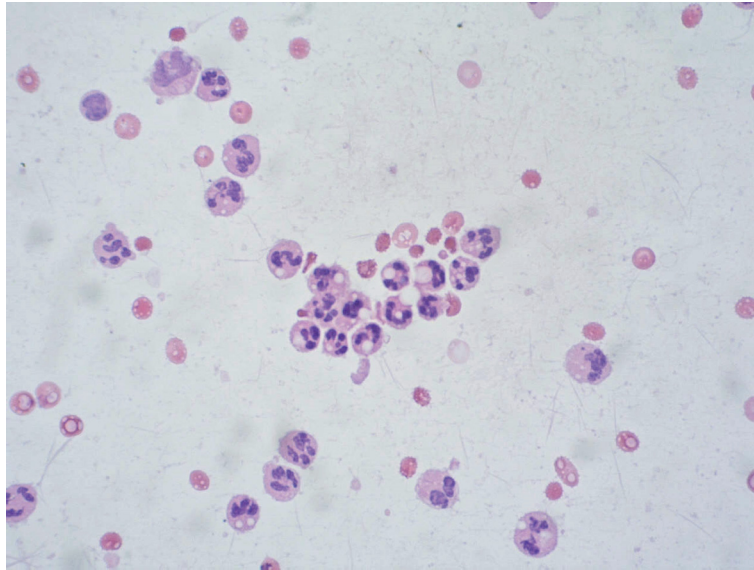


Abb. 2: Granulozytär betonter, zellreicher Liquor cerebrospinalis bei florider bakterieller Entzündung, HE-Färbung, 40x Objektivvergrößerung

In Abhängigkeit vom Reiz entstehen dabei unterschiedliche Besiedelungsmuster. Bei einer Blutkontamination oder einer Medikamenteninstillierung verbleiben die Granulozyten deutlich länger als beispielsweise bei einem viralen Infekt (Zettl et al., 2005). Innerhalb weniger Stunden kann es je nach Entzündungsursache zu einem massiven Anstieg der Zellzahl kommen. Die Anzahl kann dann bis zu 10.000 pro Mikroliter betragen (Kölmel, 1998). Da die Überlebenszeit der neutrophilen Granulozyten auf nur wenige Stunden beschränkt ist, bekommt der Zytologe das volle Ausmaß der Pleozytose

¹ Alle im Folgenden gezeigten zytologischen Bilder der Abb. 2 - 7 sowie die weiter hinten dargestellte Abb. 10 entstammen den Beständen des Schwerpunktes Cytopathologie der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf bzw. des Pathologischen Institutes Koblenz (Biesterfeld 2015).

kaum zu sehen. Die Punktion wird in Abhängigkeit der Entzündungsart meist zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt.

Ausnahmen stellen fulminante Ereignisse wie eine eitrige bakterielle Meningitis dar, bei der die klinischen Symptome derart eindeutig sind, dass die Indikation zur Punktion auch schnell gestellt werden kann. Da diese Erkrankung klinisch in der Regel fulminant mit Nackensteife, Meningismus und neurologischen Ausfällen typisch verläuft, kommt der Zytologie im Wesentlichen nur die Bestätigung der klinischen Diagnose zu. Im oft nur mehrstündigen Verlauf verändert sich die Morphologie der Granulozyten. Zerfallende und hypersegmentierte Zellformen entsprechen nach mehreren Stunden dem typischen eitrigen Bild.

Die Differenzierung der Erreger ist hingegen bei einer bakteriellen Meningitis mittels klassischer Zytologie nur begrenzt möglich und auch klinischerseits nicht verlangt, sondern fällt in die Zuständigkeit der Medizinischen Mikrobiologie. Eine entscheidende Rolle bei der Erkennung einer bakteriellen Meningitis kann laborchemisch auch dem Procalcitonin-Level im Serum zukommen (Ray et al., 2007; Viallon et al., 2011). Seitens der Zytopathologie sind nur allgemeine Aussagen darüber möglich, ob stäbchenförmige Bakterien oder Kokken bzw. Pilze vorliegen; insbesondere nicht erreichbar ist eine therapeutisch umsetzbare Subtypisierung.

Chronisch-entzündliche Zellbilder

Bei diesem sehr breiten Formenkreis von Erkrankungen, der nicht selten auf eine virale Infektion zurückgeht, stehen in der Zytologie Veränderungen in der Zahl von Lymphozyten und Monozyten sowie deren geschätztes prozentuales Verhältnis zueinander im Vordergrund (Abb. 3, Abb. 4). Entsprechend werden in den Befunden Formulierungen wie „leichtgradig“, „mäßiggradig“ oder „deutlich ausgeprägt“ für die Schätzung der Zellzahl und Begriffe wie „lymphozytäre Pleozytose“, „lymphomonozytäre Pleozytose“ oder „monozytäre Pleozytose“ etc. für die Schätzung des Verhältnisses der beiden Zellarten zueinander verwendet. Genauso sind aber auch gemischte Pleozytosen möglich, wenn lymphomonozytäre Zellen und Granulozyten parallel auftreten (Abbildung 4).

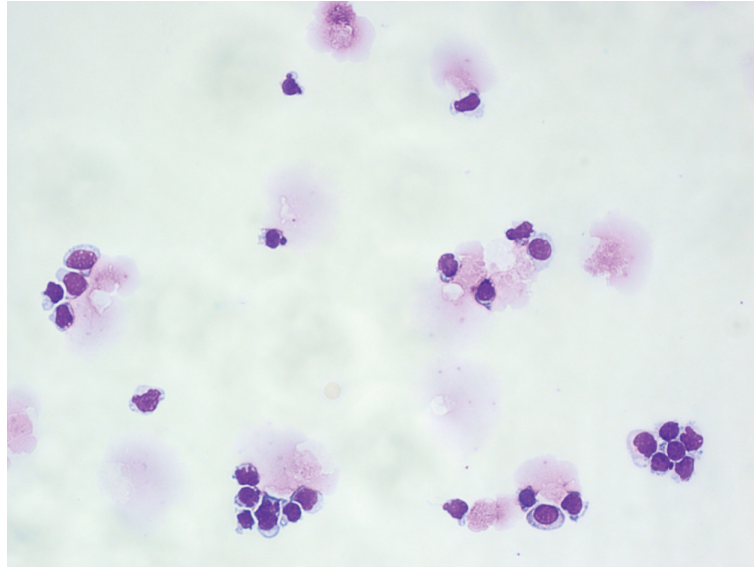


Abb. 3: Mäßiggradige lymphomonozitäre Pleozytose des Liquor cerebrospinalis bei chronischer Entzündung, serologisch hier bei Infektion mit Varizellen-Zoster-Viren (VZV), MGG-Färbung, 40x Objektivvergrößerung

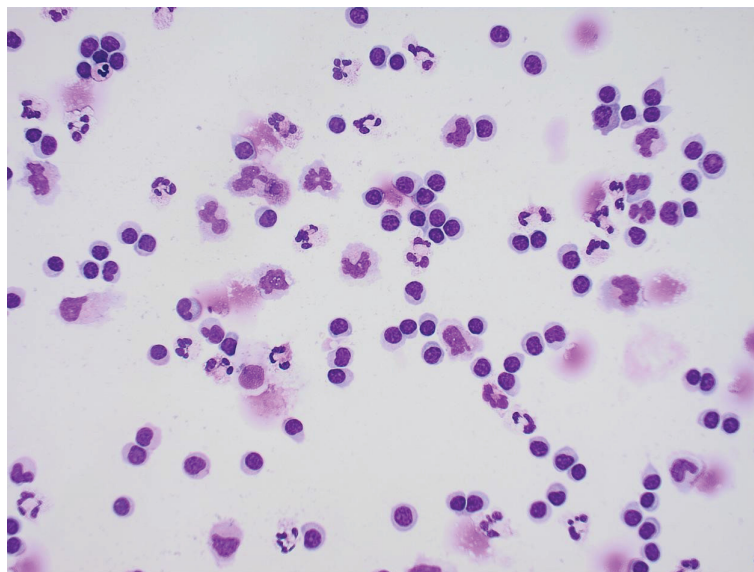


Abb. 4: Mäßiggradige gemischtzellige Pleozytose des Liquor cerebrospinalis bei ätiologisch unklarer chronischer Entzündung; MGG-Färbung, 40x Objektivvergrößerung

Rückschlüsse auf die Art der chronischen Entzündung sind kaum verlässlich möglich, sondern bleiben weitgehend klinisch-bildgebenden bzw. serologischen Untersuchungen vorbehalten. Möglich sind unter anderem eine virale Infektion, aber auch chronische bakterielle Erkrankungen wie z.B. Neuroborreliose oder Tuberkulose. Letztere könnte, muss aber nicht auch mehrkernige Riesenzellen oder eine Beimengung von Epitheloid-

zellen zeigen. Weitere wichtige Ursachen für Pleozytosen sind alle Erkrankungen, die Hirndruck auslösen, da die vermehrte Ausschwemmung von lymphomonozytären Zellen im Grunde eine unspezifische Reaktion darstellt. Finden sich ergänzend auch ältere Erythrozyten oder Hämosiderin-beladene Makrophagen, so kann auf eine ältere Einblutung in den Liquorraum rückgeschlossen werden, ohne dass sich deren Ursache erschließen ließe. Hämosiderin ist in der Routinefärbung an seiner braunen bzw. nach einer ergänzenden Eisenfärbung an seiner blauen Färbung erkennbar.

1.4.5 Zellbilder neoplastischer Erkrankungen im Liquor cerebrospinalis

Für die Erkennung von Neoplasien stehen Beurteilungskriterien zur Verfügung, die unten im Kapitel „Material und Methoden“ kurz genannt sind. Je mehr von diesen Kriterien auf eine Liquorprobe zutreffen, desto sicherer kann die Diagnose gestellt werden. Zur Dignitätsabklärung werden Malignitätsmerkmale wie charakteristische Veränderungen am Zellkern und am Zytoplasma herangezogen.

Als Liquorraum-eigener Tumor wären das gutartige Ependymom und ferner alle in der aktuellen WHO-Klassifikation (Louis 2016, Louis et al. 2016) zusammengestellten primären Tumorentitäten des ZNS zu bedenken. Die ZNS-Tumoren, darunter Astrozytome, Oligodendrogliome, Medulloblastome und Glioblastome als wichtigste Entitäten, decken dabei das gesamte Spektrum zwischen prospektiver Gutartigkeit (WHO-Grad I) und definitiver Bösartigkeit (WHO-Grad IV) ab. Aufgabe der Liquorzytologie kann dabei in aller Regel nicht die Typisierung der Tumorentität sein, sondern rein die Identifikation von Tumorzellen eines neuronal differenzierten Tumors, üblicherweise durch den immunhistochemischen Nachweis einer neuronalen Differenzierung (z. B. GFAP).

Während Sarkome kaum in das Gehirn oder die Liquorräume metastasieren, kommen Metastasen von Karzinomen vergleichsweise häufig vor, bezeichnet als „Meningeosis carcinomatosa“ (Abb. 5, Abb. 6). Typische Kandidaten sind Lungenkarzinome, Mammakarzinome, aber auch Nierenkarzinome, Schilddrüsenkarzinome und Karzinome des Gastrointestinaltraktes. Die Annahme einer Meningeosis carcinomatosa wird durch den

immunhistochemischen Nachweis epithelialer Marker untermauert; manche ergänzenden Marker wie TTF-1 oder GATA-3 sind im klinischen und morphologischen Kontext auch zur Identifikation des Primärtumors geeignet.

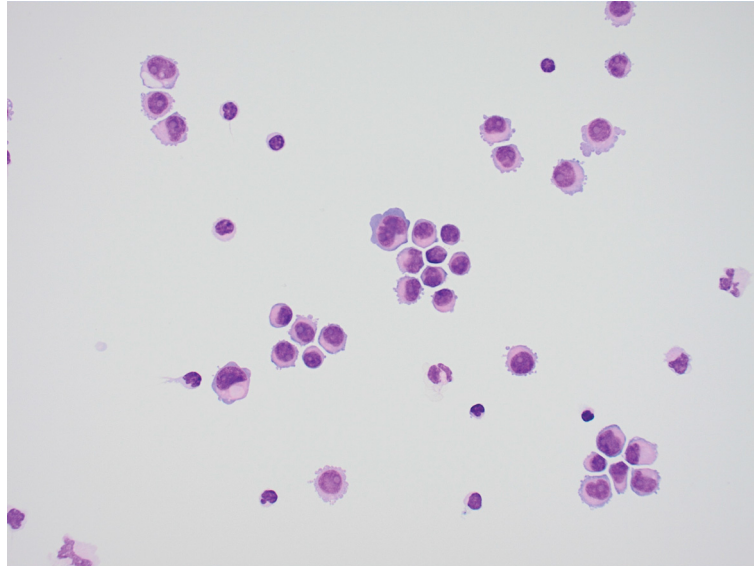


Abb. 5: Meningeosis carcinomatosa: Nachweis von epithelialen Tumorzellen im Liquor, klinisch bei bekanntem Mammakarzinom, MGG-Färbung, 40x Objektivvergrößerung

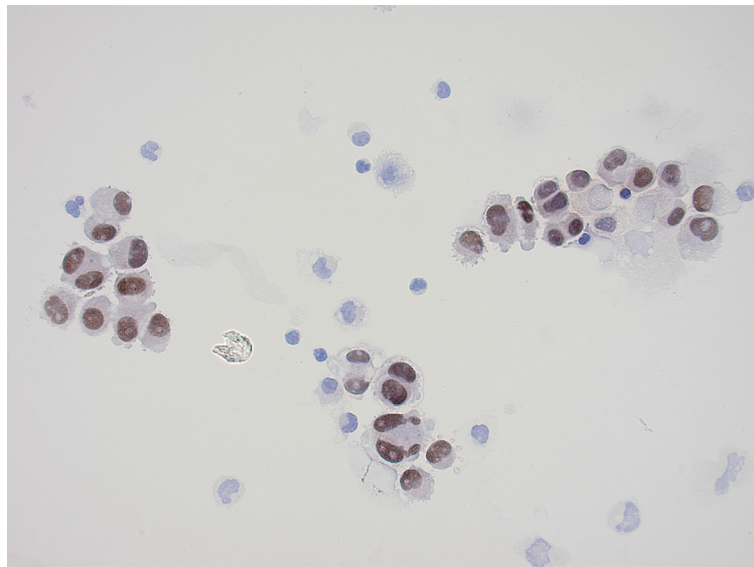


Abb. 6: Immunzytochemische Zuordnung von Tumorzellen einer Meningeosis carcinomatosa zu einem Mammakarzinom bei GATA3-Positivität, 40x Objektivvergrößerung. Gleicher Fall wie Abbildung 5.

Eine seltene Differentialdiagnose zu einem hoch differenzierten Adenokarzinom wären ortsständige Ependymzellen, die epitheliale Marker wie HEA-125 oder Zytokeratin aufweisen. Als Raritäten könnten eine intrathekale Endometriose oder ein intrathekal gelegenes Hamartom mit epithelialer Komponente vorkommen. Prinzipiell könnten bei diesen sehr seltenen Konstellationen falsch positive Liquordiagnosen auftreten.

Relativ selten, aber möglich wären auch Absiedlungen eines malignen Melanoms im Liquor; die Inzidenz hierfür wird mit ca. 10% angegeben (Oschmann et al., 2006). Zellen eines malignen Melanoms sehen oft epithelialen Zellen ähnlich, sodass eine Abgrenzung gegenüber einer Meningeosis carcinomatosa notwendig ist, gerade wenn die für melanozytäre Zellen typische bräunliche Pigmentierung nicht mehr nachweisbar ist („amelanotisches Melanom“). Andererseits müssen bräunlich pigmentierte Zellen nicht zwangsläufig von einem Melanom stammen, sondern könnten auch den bereits oben erwähnten Hämosiderin-beladenen Makrophagen zuzurechnen sein. Die Identifikation von Zellen eines malignen Melanoms gelingt durch die Anwendung typischer immunzytochemischer Marker wie S-100 oder Melan-A.

Die Diagnosen von Leukämien und Lymphomen im Liquor kann einfach, aber auch sehr schwierig sein. Beteiligungen der Liquorräume durch eine nicht vorbehandelte akute myeloische Leukämie (AML) oder durch ein nicht vorbehandeltes hoch malignes Non-Hodgkin-Lymphom sind relativ leicht zu diagnostizieren, da sich oft viele atypische Zellen mit charakteristischer Morphologie nachweisen lassen (Abb. 7).

Die Rezidivsuche bei diesen Erkrankungen ist hingegen sehr anspruchsvoll, da nach der üblichen Chemotherapie, die teilweise auch intrathekal gegeben wird, erhebliche Reizformen von blutbildenden Zellen und Makrophagen auftreten, gegenüber denen sich maligne Zellen nur schwer, gelegentlich auch gar nicht abgrenzen lassen. Niedrig maligne Non-Hodgkin-Lymphome vom B-Zell-Typ, darunter auch die chronisch-lymphatische Leukämie (B-CLL), sind im Liquor oft nicht zu sichern; auch der immunzytochemische Nachweis vieler B-Zellen in einem lymphomonozytären Infiltrat ist nur als Hinweis, aber nicht als Nachweis für ein solches Lymphom zu verstehen. Chronisch-myeloische Leukämien (CML) und Hodgkin-Lymphome lassen sich ebenfalls meistens nicht im Liquor diagnostizieren.

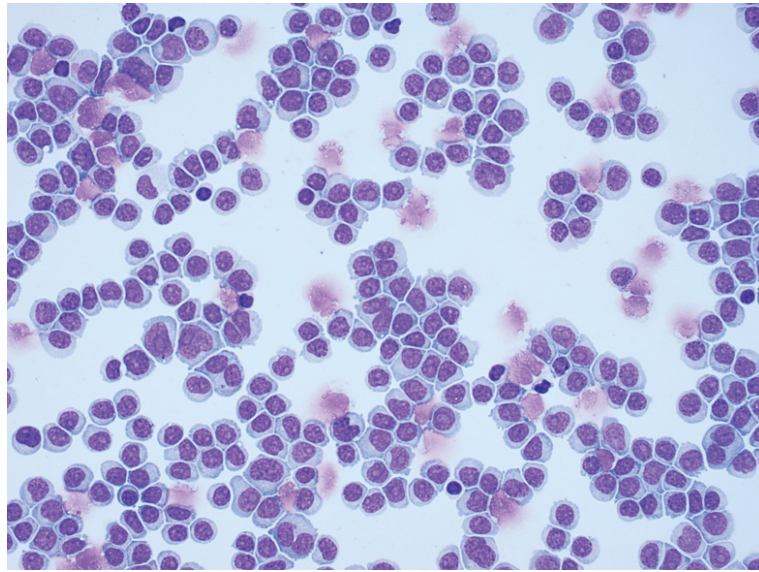


Abb. 7: Meningeosis lymphomatosa: Nachweis von lymphatischen Tumorzellen im Liquor, klinisch bei bekanntem Mantelzell-Lymphom, MGG-Färbung, 40x Objektivvergrößerung

Zusammenfassend gilt, dass die Tumordiagnostik im Liquor vor mehreren Problemen steht. Zum einen ist die Zahl auffälliger Zellen im Liquor oft klein, was die Möglichkeiten insbesondere der adjuvanten Diagnostik, vor allem der Immunzytochemie, einschränkt. Außerdem ist es nicht immer leicht, bei auffälligen Zellen eine Abgrenzung gegen reaktive Zellen vorzunehmen. Schließlich sind auch bei eindeutig Tumor-positiven Situationen Fehlinterpretationen bezüglich der Tumorentität möglich. Gill et al. (2015) beispielsweise berichteten über einen Fall, in dem ein Rezidiv eines vorher resezierten Glioblastoms fälschlicherweise als Metastase diagnostiziert wurde, da die Zellmorphologie eher auf eine epitheliale Differenzierung deutete.

Insgesamt stellt sich also die Diagnostik maligner Erkrankungen im Liquor als anspruchsvoll dar. Daher ist wichtig, möglichst optimale Bedingungen für die Diagnostik zu schaffen. Hierzu gehört die frühe und schonende Verarbeitung der Liquorprobe zu gut gefärbten und optimalen Präparaten. Außerdem sollte eine genügend große Menge Liquor zur Verfügung stehen, wobei sich hier keine klaren Empfehlungen aus der Literatur ableiten lassen. Außerdem ist es sehr wichtig, bei Abwesenheit von malignen Zellen im Präparat nicht die Diagnosekette abubrechen, sondern weiter in Hinblick auf ein eventuelles Tumorgeschehen zu untersuchen und keine Zeit zu verlieren - ein Fehlen

von Tumorzellen in einer Liquorprobe schließt nicht à priori die Möglichkeit einer Tumormeningeose aus (Glantz et al., 1998).

1.5 Diagnostische Aussagekraft der Liquorzytologie

Bei klinisch-zytologischen Studien am eigenen Krankengut ist üblich, Treffsicherheiten zu berechnen und sich auf Treffsicherheitsstudien anderer zu beziehen. Dieses ist aufgrund spezifischer Gegebenheiten in der Liquorzytologie nicht so einfach möglich und wird in der Diskussion noch genauer erörtert.

Festzuhalten ist aber allgemein, dass der klinische Status eines Patienten hier besonders schwer zu eruieren ist. Ob ein Patient, bei dem eine Liquorprobe wegen Tumorverdachts entnommen wird, wirklich „positiv“ im Sinne einer Beteiligung der Liquorräume ist, kann in der Regel zwar *ex iuvantibus* aus einem positiven Ergebnis der Liquorzytologie rückgeschlossen werden, nicht aber, dass er wirklich „negativ“ ist. Findet man nämlich keine Tumorzellen, so bleibt mangels alternativer diagnostischer Maßnahme die Frage nach einer „richtig negativen“ oder einer „falsch negativen“ morphologischen Diagnose im Grunde offen. Darüber hinaus spielt auch eine Rolle, aus welchen Malignomarten eine Studie zusammengesetzt ist, da sich die Erkennungsraten zwischen den Entitäten unterscheiden. In einer grundlegenden Arbeit von Gondos und King (1976) beispielsweise waren 32,2% der Fälle von primären ZNS-Tumoren positiv, hingegen mehr als 70% der Fälle von Karzinommetastasen.

Eine Methode, mit der man versucht, die Diagnose einer Meningeosis carcinomatosa auch klinisch-bildgebend zu stellen und mit der Liquorzytologie zu korrelieren, ist die Kernspintomographie. Entsprechend gibt es Arbeiten, in denen sich die Treffsicherheit auf eine Kombination aus Zytologie und Kernspintomographie stützt. Je nachdem, wie man den Standard definiert, ergeben sich aber erhebliche Schwankungen in den Zahlen, die eine wirkliche Bewertung schwierig machen. Dies soll exemplarisch an Arbeiten von Freilich et al. (1995) und Straathof et al. (1999) veranschaulicht werden:

In der Studie von Freilich standen für 106 Fälle MRT-Daten und Zytologiedaten zur Verfügung. Dabei wurden 58 MRT-Ergebnisse als positiv bewertet, 48 als negativ, ferner 49 Zytologie-Befunde als positiv und 57 als negativ. Legt man die MRT-Befunde als

ausschließlichen Standard zugrunde, so beträgt die Sensitivität der Zytologie 63,8% (37/58) und die Spezifität 75% (36/48); werden MRT und Zytologie gemeinsam als Standard betrachtet, also Positivität angenommen, wenn mindestens eine der beiden Methoden als positiv bewertet wird, so liegen die entsprechenden Werte bei 70% (49/70) bzw. 100% (36/36), weichen also deutlich ab. Zu ähnlichen Ergebnissen kam die gleichartig angelegte, kleinere Arbeit an 61 Fällen von Straathof mit entsprechenden Werten für Sensitivität und Spezifität von 68,4% (26/38) und 60,9% (14/23) bzw. von 74,5% (35/47) und 100% (14/14). Insgesamt muss bei diesem Ansatz außerdem bedacht werden, dass die Konkordanz zwischen beiden Methoden nur 68,9% (73/106) bzw. 62,3% (38/61) betrug.

Ein anderer Ansatz liegt darin, die diagnostische Aussagekraft der Liquorzytologie an dem Zuwachs positiver Fälle bei wiederholten Entnahmen zu bestimmen. Dazu haben Glantz et al. (1998) in ihrer Arbeit „*Cerebrospinal Fluid Cytology in Patients with Cancer. Minimizing False-Negative Results*“ eine Zusammenstellung anderer Arbeiten überwiegend aus den 90er Jahren vorgenommen, in denen mehrere Liquorentnahmen dokumentiert waren. Bezogen auf 532 Fälle ermittelten sie eine Steigerung der Zahl kumulativ positiver Fälle nach der zweiten Punktion um 15 Prozentpunkte und bei der dritten Punktion um weitere vier Prozentpunkte gegenüber den Ergebnissen der Erstpunktionen, sodass sich offenbar Wiederholungspunktionen lohnen können. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Kaplan et al. (1990) in einer kleineren Studie, in der von den endgültig zytologisch positiven Fällen 71% in der ersten Punktion gesichert wurden, 21% in der zweiten Punktion und die übrigen 8% durch drei und mehr Punktionen.

Punktiert man dabei näher an der aufgrund der neurologischen Symptomatik zu erwartenden Befallsregion im Rückenmarkskanal, so steigt die Rate von positiven Befunden ebenfalls (Glantz et al. 1998). Entsprechend wird die Wiederholung einer Liquorzytologie bei klinischem Verdacht auf eine Meningeose, aber negativem zytologischen Befund, empfohlen (Stojmenovic et al., 2016). Insbesondere scheinen lumbale Erstpunktionen mit einer geringen Trefferquote behaftet zu sein (Balm und Hammack, 1996; Kaplan et al. 1990; Lee et al. 2015). Auch aus diesem Grund ist eine Notwendigkeit der Wiederholung von Liquorpunktionen gegeben (Glantz et al., 1998; Deisenhammer et al., 2006; Lee et al., 2015).

Schließlich helfen adjuvante Methoden, um die Zahl positiver Fälle zu erhöhen. Insbesondere kann man mit immunzytochemischer Anwendung von Zytokeratin-Antikörpern die Verdachtsdiagnose einer Meningeose bei positivem Reaktionsausfall absichern. Der diagnostische Zuwachs wurde in der Vergangenheit nach Anwendung von bis zu sieben Antikörpern mit ca. 7-10 Prozentpunkten angegeben (Boogerd et al. 1988), was nicht sehr viel ist, aber dennoch in konkreten Fällen eine eindeutige Diagnose ermöglicht. Heute bezieht man sich bei der Immunzytochemie vor allem auf Ergebnissen mit EpCAM-Antikörpern (HEA-125, ESA, MOC-31). Außerdem wäre die Durchflusszytometrie als Komplementärmethode zur Liquorzytologie zu nennen, die ebenfalls sinnbringend in der Tumordiagnostik am Liquor eingesetzt wird (Shin et al. 2016, Ranta et al. 2015).

1.6 Problemstellung

Nach wie vor gehört die Liquordiagnostik zu den wesentlichen Standbeinen in der Abklärung von Patienten mit neurologischen Auffälligkeiten, auch wenn sich in den vergangenen Jahrzehnten über den rapiden Fortschritt insbesondere in der Schnittbilddiagnostik (CT, MRT) bestimmte Gewichte in der Diagnostik verschoben haben. Eine hohe Bedeutung kommt der Liquordiagnostik dabei nicht nur im Hinblick auf mikrobiologische und klinisch-chemische Untersuchungen zu, sondern auch bezogen auf zytologische Veränderungen, die von Pathologen bzw. Neuropathologen vorgenommen werden. Die Qualität der Liquorzytologie wurde bereits in der Arbeit von Wiethölter et al. (1979) analysiert und ihre Wertigkeit im diagnostischen Spektrum des klinischen Alltags unterstrichen. Für die häufigsten entzündlichen und malignen Erkrankungen in der Neurologie geben die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und klinische Neurochemie eine sehr gute Übersicht über Indikationsstellungen sowie über die klinisch relevante Liquordiagnostik und der damit verbundenen Überlegungen und Vorgehensweisen (Petereit et al., 2007).

Am Universitätsklinikum Düsseldorf ist seit den 70er Jahren ein eigenständiger diagnostischer Schwerpunkt für Cytopathologie innerhalb des Faches Pathologie etabliert, derzeit organisiert als Funktionsbereich (Gemeinsame Leitung: Dr. Schramm / Dr. Pomjanski). Bei diesem handelt es sich, bezogen auf die Beurteilung von so-

genannten „extragynäkologischen“ Materialien, also Feinnadelpunktionen von soliden Läsionen, Abstrichentnahmen von Oberflächen und Aufarbeitung von Flüssigkeiten aus allen Gebieten des Körpers mit der Ausnahme der gynäkologischen Vorsorgezytologie, um den größten universitären Schwerpunkt in Deutschland mit derzeit ca. 11.000 solcher Fälle pro Jahr. Darunter befinden sich auch Liquorpunktate aus verschiedenen Neurologischen und Neurochirurgischen Kliniken. Bearbeitet werden diese Proben zunächst in konventioneller Weise. Bei entsprechender Indikation, vor allem zur Identifikation und Typisierung von Tumorzellen, werden am Schwerpunkt etablierte adjuvante Methoden angeschlossen (Biesterfeld et al., 2013).

Eine wissenschaftliche Aufarbeitung der zytologischen Liquordiagnostik am Schwerpunkt Cytopathologie wurde bisher noch nicht vorgenommen und soll Inhalt der hier vorgelegten Studie sein. Hauptziel der Arbeit ist es, im Kontext der wissenschaftlichen Literatur eine gegenwärtige Aussage zur Verlässlichkeit der zytologischen Liquordiagnostik anhand einer repräsentativen Fallzahl zu erstellen. Dabei soll nicht nur auf Fälle mit klinischen Tumorverdacht abgehoben werden, sondern auch die Möglichkeiten und Grenzen der Diagnostik entzündlicher oder anderweitig biologisch gutartiger Erkrankungen ermittelt werden.

Zu der Studie wurde ein Ethikvotum von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf eingeholt (Studiennummer 4218 vom 8.4.2013).

2 Material und Methoden

2.1 Fallkollektiv

2.1.1 Patientenauswahl

In der vorliegenden Arbeit wurde eine retrospektive Aufarbeitung von klinischen Fällen vorgenommen, bei denen die Patienten einer oder mehreren Liquorpunktionen unterzogen wurden. Punktiert wurden Patienten, die akute oder chronische neurologische Auffälligkeiten zeigten oder eine bereits bestehende maligne oder benigne Erkrankung hatten und diesbezüglich im Verdacht einer meningealen Ausbreitung standen.

Die Gesamtzahl der untersuchten Liquorproben, die allesamt an das Institut für Cytopathologie der Heinrich Heine Universität eingesandt worden waren, betrug 252 und deckte fortlaufend den gesamten Zeitraum vom 1.1.2008 bis 31.12.2009 ab. Alle untersuchten Patientenfälle stammen aus dem Universitätsklinikum Düsseldorf und konnten mithilfe des digitalen klinikinternen Archivs Medico eingesehen und rekonstruiert werden. Aus den vorhandenen Akten konnten röntgenologische Befunde, CT- und MRT-Ergebnisse aus Arztbriefen und Konsilschreiben, ebenso wie klinische Diagnosen weiterer Untersuchungen zum Vergleich herangezogen und ein klinisches Follow-Up erstellt werden.

Die 252 Proben stammten allerdings nur von 184 Patienten, da einige Patienten in einem kurzen Zeitraum mehrfach punktiert wurden. In Fällen mit multiplen Proben wurden die Diagnosen zu einer möglichst aussagekräftigen Gesamtdiagnose zusammengezogen. Ausgeschlossen wurden drei Fälle, bei denen das Zellmaterial unzureichend war, sowie zwei Fälle, bei denen die Aktenlage der Patienten für das Follow-Up nicht ausreichend war.

Somit standen zusammenfassend für die hier vorgelegte Studie 179 Fälle zur Verfügung.

2.1.2 Geschlechterverteilung

Innerhalb der 179 Patienten lag eine deutliche Überzahl an männlichen Patienten vor. Wie im Diagramm ersichtlich, wurden 68 weibliche Patienten untersucht sowie 111 männliche Patienten (Abb. 7). Dies entspricht einem relativen Anteil weiblicher Patienten von ca. 38% und folglich einem relativen Anteil männlicher Patienten von etwa 62%.

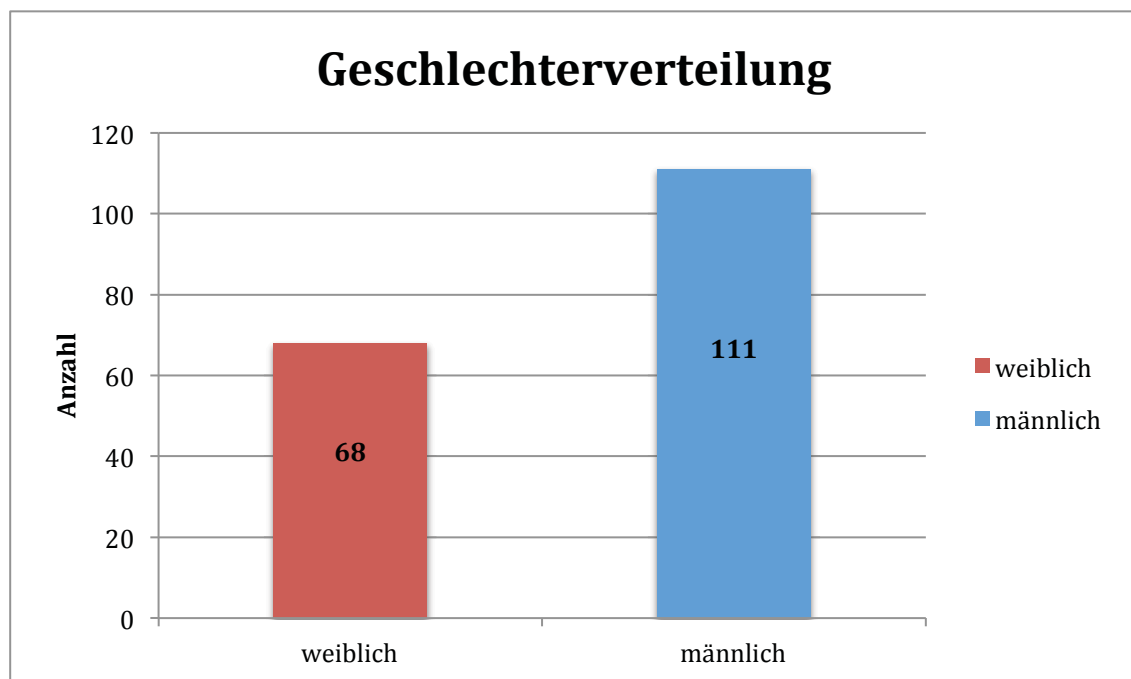


Abb. 7: Geschlechterverteilung der 179 in die Studie aufgenommenen Patienten

2.1.3 Altersverteilung

In der Altersverteilung zeigt sich mit zunehmendem Alter ein gleichmäßiger Anstieg an Patientenfällen mit dem Maximum in der Gruppe der 51 - 60-Jährigen. Im Anschluss an diese Gruppe kommt es zu einem ebenfalls gleichmäßigen Abfall der Fallzahl bis einschließlich der Gruppe der 81 - 90-Jährigen. Die Einteilung in Altersgruppen wird in Abb. 8 verdeutlicht.

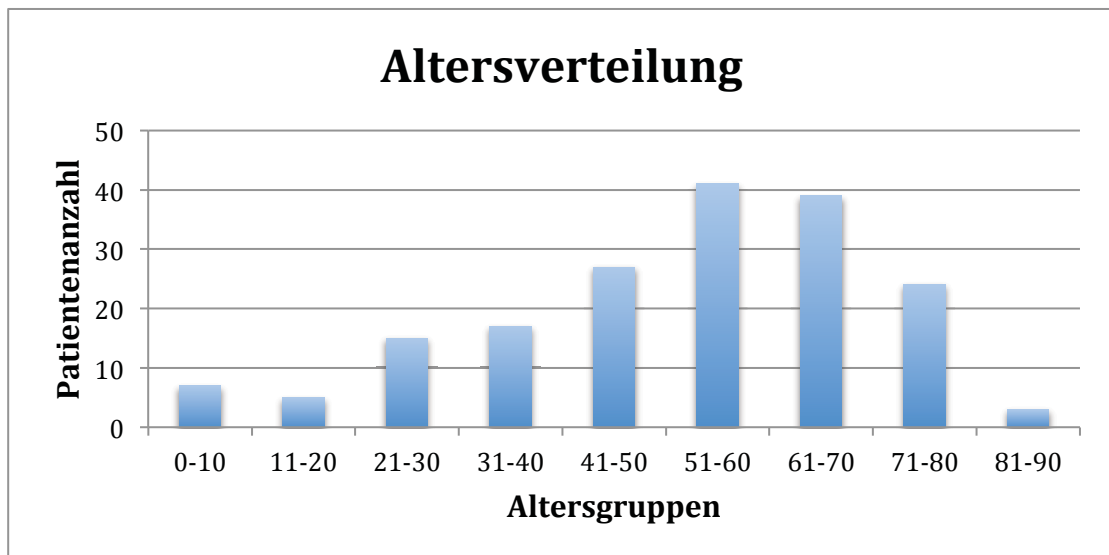


Abb. 8: Altersverteilung der 179 in die Studie aufgenommenen Patienten

Wenn man sich die Altersverteilung geschlechterspezifisch anschaut, so fällt auf, dass in den Altersgruppen 0 - 10 sowie 31 - 40 ein Abfall der weiblichen Patientenzahl zu verzeichnen ist, mit einer Maximalzahl an Fällen in der Gruppe der 60 - 71-jährigen Patientinnen. In der männlichen Patientenpopulation kommt es zu einer homogenen Verteilung der Fallzahlen mit einem Maximum in der Gruppe der 51 - 60-jährigen. Die geschlechterspezifische Altersverteilung ist in Abbildung 9 dargestellt.

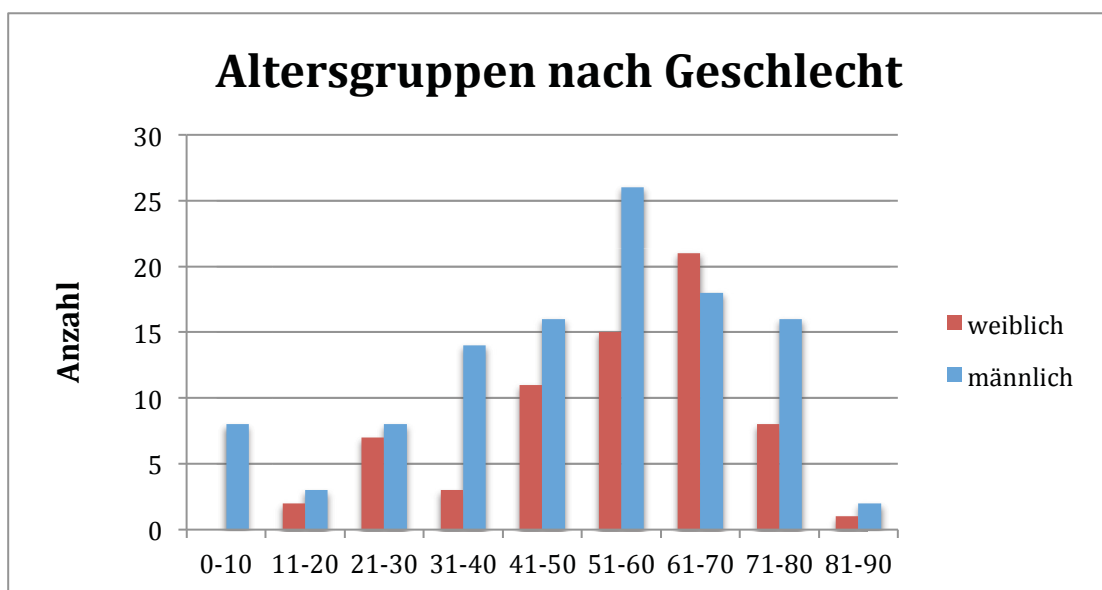


Abb. 9: Geschlechtsspezifische Altersverteilung der 179 in die Studie aufgenommenen Patienten

Das Durchschnittsalter der Frauen betrug 54,2 Jahre, wobei die jüngste Patientin 12 Jahre und die älteste Patientin 81 Jahre alt war. Der jüngste männliche Patient war nur 5 Monate alt, während der älteste 85 Jahre alt war. Das Durchschnittsalter der Männer betrug 49,3 Jahre.

2.2 Materialgewinnung und Präparation

Übersandt wurden in den meisten Fällen unfixierte Liquorproben. Einzelne Proben waren Formalin-fixiert. Ferner kamen einzelne Fälle vor, in denen bereits fertige zytologische Präparate vorlagen, z.B. aus der Kinderonkologie.

2.2.1 Herstellung der Präparate

Die Verarbeitung des gewonnenen Liquors an der Universität Düsseldorf im Funktionsbereich Cytopathologie verläuft nach Erhalt der Probe gemäß den dort hinterlegten *Standard Operation Procedures* (SOP) wie folgt:

1. Objektträger vor der Zentrifugation mit Poly-L-Lysin-Lösung (Sigma P 8920, 1:1 mit Aqua dest. verdünnt) mittels Mulltupfer sehr dünn bestreichen und an der Luft trocknen lassen.
2. Kleine Kammergrößen (1 oder 2 ml) der Hettich-Zytozentrifuge bei Proben bis zu ca. 20.000 Zellen verwenden. Bei höheren Zellzahlen sind größere Kammern notwendig.
3. Zu geringe Volumina (1-2 Tropfen) mit 20 %iger Humanalbuminlösung auf ca. 0,5 ml auffüllen.
4. Zentrifugation bei 1.000 U/min für 10 Minuten (bei Rotordurchmesser 10-11 cm).
5. Bei Verwendung der Hettich-Zentrifuge Überstand vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette absaugen, ohne das Sediment aufzuwirbeln.
6. Sediment sofort auf dem Objektträger lufttrocknen (z. B. durch Zentrifugieren bei Verwendung der Hettich-Zentrifuge, Ventilator- oder Wärmeschrankbehandlung bei ca. 40 °C).

Im Anschluss an die Zytozentrifugation werden die luftgetrockneten Präparate gemäß SOP nach May-Grünwald-Giemsa (MGG) gefärbt. Hierbei handelt es sich um eine Mehr-Schritt-Differentialfärbung, die auch in der Hämatologie gebräuchlich ist (Abb. 10).

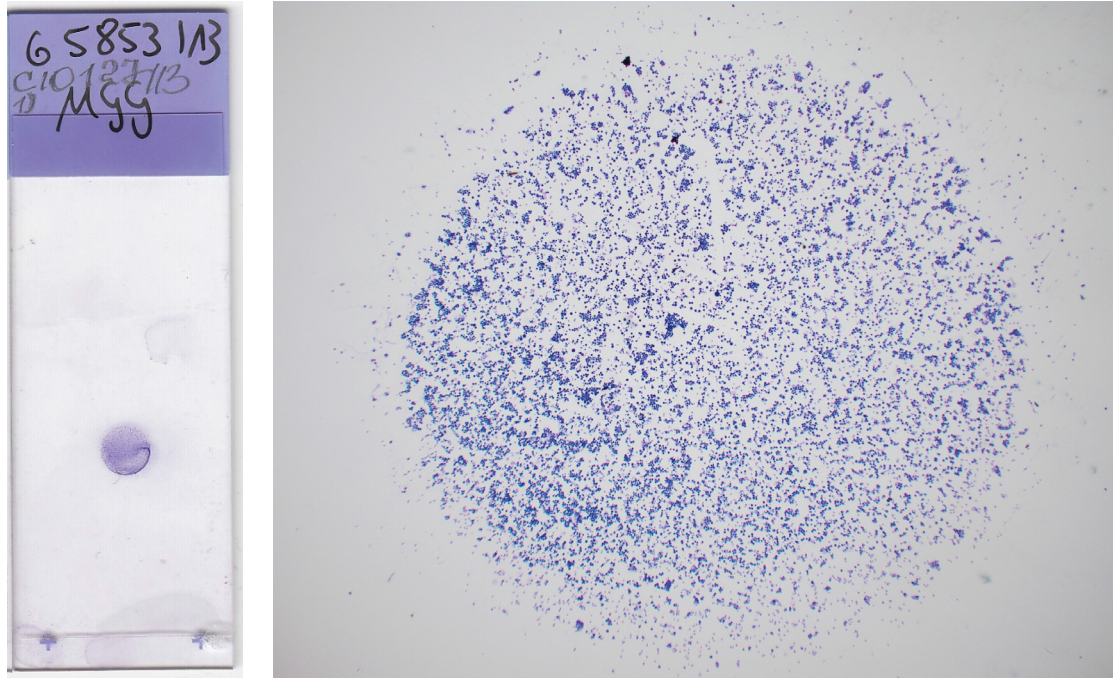


Abb. 10: Liquorzytologisches Präparat. Links: Scan eines MGG-gefärbten Objektträgers mit auf eine kleine, definierte Fläche zentrifugierten Zellen. Rechts: Zellreiches Liquorpräparat, MGG-Färbung, 2x Objektivvergrößerung

2.3 Zytodiagnostik

2.3.1 Mikroskopische Untersuchung der Präparate

Die zytologische Diagnostik der MGG-gefärbten Präparate erfolgt durch einen Facharzt für Pathologie anhand üblicher Kriterien der Zytopathologie, wie sie auch an Präparationen anderer Materialien üblich sind. Als Leitfaden zur Erkennung der Zellbilder gelten die allgemeinen Kriterien der Zytopathologie, wie sie in Lehrbüchern, insbesondere dem detaillierten zweibändigen Standardwerk von Koss und Melamed (2006), dargelegt sind.

Dabei folgt die Erkennung und Beurteilung der in der Einleitung vorgestellten entzündlichen Zellbilder der subjektiv vom Untersucher geschätzten Zahl und relativen Anteile von Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und ggfls. Makrophagen. Außerdem wird eine Erythrozytenbeimengung dokumentiert und diagnostisch interpretiert.

Für Tumorzellen oder tumorverdächtige Zellen gibt es eine Reihe von Kriterien, welche es ermöglichen sollen, diese von der normal vorhandenen Zellpopulation zu differenzieren. Das Zellbild ist bei eingewanderten malignen Zellen in der Gesamtheit aber oft nicht stark beeinflusst bzw. verändert, was den Nachweis von Tumorzellen erschwert. Als zytologische Malignitätskriterien (Koss und Melamed 2006, Feichter und Dalquen 2000, Bubendorf et al. 2011) werden, modifiziert für die Liquorzytologie, berücksichtigt (Oehmichen, 1976; Kölmel, 1978; Torzewski et al., 2008):

- Ungewöhnlich große Zellen
- Große und abnorm begrenzte polymorphe Kerne
- Hyperchromasie der Zellkerne
- Inhomogene Chromatinverteilung
- Erhöhte Zahl von Nukleolen
- Nachweis von Kernfragmenten, sogenannten „akzessorischen Kernen“
- Erhöhte mitotische Aktivität
- Atypische Mitosen
- Stark basophiles Zytoplasma aufgrund erhöhten RNA-Gehaltes
- Variabel gestaltete Zellmembran
- Zytoplasmatische Einschlüsse und Siegelringzellen
- Verschiebung der Kern-Plasma Relation zugunsten des Kerns

Aufgrund der Tatsache, dass Tumorzellen im Liquor oft nur einzeln oder in nur kleinen Zellgruppen vorkommen, wird auf die Angabe eines Malignitätsgrades (G1, G2, G3, G4) häufig verzichtet.

Sofern noch weitere ungefärbte Präparate vorliegen, sind im Falle eines Tumorverdachtes oder einer definitiven Tumordiagnose ergänzende immunzytologische Untersuchungen möglich. Diese werden fachärztlich angeordnet, wobei sich das

Spektrum an der in der MGG-Färbung gestellten Diagnose und an klinischen Angaben (insbesondere bei bekanntem Primärtumor) orientiert. Die Durchführung erfolgt nach den SOP des Funktionsbereiches Cytopathologie.

2.3.2 Schriftliche Befunderstellung

Bei der schriftlichen Befundung werden zunächst in einem beschreibenden Teil die vorkommenden Zellarten benannt und zum Teil semiquantitativ in ihrer Häufigkeit angegeben. Im eigentlichen Befund wird in der Cytopathologie der Universität Düsseldorf nach dem von Böcking entwickelten Klassifikationssystem in fünf Kategorien gearbeitet, welche wie folgt definiert sind (Böcking, 1998)

Unzureichend bedeutet, dass aufgrund zu geringer Materialmenge, technisch unbefriedigender Aufbereitung oder zu langer Transport- oder Aufbewahrungszeit die Autolyse der Zellen zu weit fortgeschritten ist. Somit steht im Liquor zu wenig oder zu schlecht erhaltenes Zellmaterial zur Verfügung, um eine sichere Diagnose stellen zu können.

Eine (*Tumorzell-*)*negative* Diagnose wird gestellt, wenn im Liquorzellpräparat ein unauffälliges Zellbild respektive ein Zellbild entzündlicher oder degenerativer Genese vorzufinden ist, jedoch keine Tumorzellen oder tumorverdächtigen Zellen nachgewiesen werden.

Zweifelhaft ist die Diagnose, wenn das Zellbild nicht mehr nur normale, sondern auch in gewisser Weise verdächtige abnorme oder lytische Zellen aufweist. Häufig zeigen sich dann auch begleitende zytologische Eigenschaften einer Entzündung. In solch einem Fall ist Malignität nicht sicher auszuschließen.

Dringender Verdacht besteht, wenn es zur Ausprägung atypischer Zellen im Präparat kommt, welche jedoch nicht ausreichend beweisend für eine Bestätigung oder einen Ausschluss von Malignität sind.

Als (*Tumorzell-*)*positiv* werden die Präparate klassifiziert, in denen es eindeutig zur Identifikation von Tumorzellen entsprechend den Kriterien der Malignität im Liquorzellbild kommt.

An diese Zuordnung zu einer Kategorie wird ein Klartext angeschlossen, um dem Einsender die zytologischen Veränderungen zu dokumentieren.

Eine typische Befundung könnte wie folgt lauten:

Übersandt wurden ca. 1,5 ml einer klaren farblosen Flüssigkeit.

Mikroskopisch erkennt man auf MGG-gefärbten Zytozentrifugaten neben einzelnen frischen Erythrozyten vorwiegend Lymphozyten und Monozyten, jeweils an Zahl leicht vermehrt. Ganz vereinzelt kommen Granulozyten vor, ferner wenige Makrophagen, in denen sich phagozytierte Erythrozytenfragmente nachweisen lassen. Keine Tumorzellen oder tumorverdächtigen Zellen.

Befund: Kein Nachweis von Tumorzellen (= negativ). Das Zellbild entspricht einer geringgradigen lymphomonozytären Pleozytose mit resorptiver Komponente, offenbar nach zurückliegender Einblutung.

2.4 Statistik

2.4.1 Grundlagen der statistischen Auswertung

Die Auswertung der erhobenen Daten in Kategorien erfolgte nach dem STARD-Schema der Universität Oxford (Bossuyt et al., 2003). Dieses Schema standardisiert die Vorgehensweise von Arbeiten über Treffsicherheit und dessen Wiedergabe von Ergebnissen unter Verwendung von Flussdiagrammen.

Grundlage der Auswertung sind die zytopathologischen Befundergebnisse, welche den Ergebnissen des klinischen Follow-Up gegenübergestellt werden.

Das klinische Follow-Up wurde, wie bereits erwähnt, aus der Medico-Datenbank des Universitätsklinikums Düsseldorf entnommen. Die Zuordnung eines Falles als „positiv“ oder „negativ“ bezogen auf einen Tumorbefall des Liquorraumes erwies sich aber als

unerwartet schwierig und heikel. Bei vielen Patienten ließ sich die Frage nach dem Charakter eines oder mehrerer Rundherde im Gehirn zwar klären, der Beleg einer Liquorraumbeteiligung ließ sich aber üblicherweise (zumindest bei negativer Zytologie) nicht eindeutig erbringen. Die Zuordnung der Fälle erfolgte letztendlich nach bestem Wissen und Gewissen durch zwei unabhängige Untersucher, deren Ergebnisse zusammengeführt wurden.

2.4.2 Kenndaten der statistischen Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgt über Vier-Felder-Tafeln (Tabelle 1), anhand derer klassische Kenndaten zur Beurteilung der Treffsicherheit ermittelt werden können, nämlich Sensitivität und Spezifität, positiver und negativer Prädiktionswert, sowie die Gesamttreffsicherheit (Hilgers et al., 2007).

Klinisches Follow-Up	Liquorzytologie		Summe
	positiv	negativ	Σ
maligne	A	B	A+B
nicht maligne	C	D	C+D
Σ	A+C	B+D	A+B+C+D

Tab. 1: Vier-Felder Tafel zur statistischen Auswertung relevanter Kenndaten

Dabei bezeichnet A die Anzahl richtig positiver Diagnosen, B die Anzahl falsch negativer Diagnosen, C die Anzahl falsch positiver Diagnosen und D die Anzahl richtig negativer Diagnosen.

Die **Sensitivität** berechnet sich als der Anteil richtig positiver zytologischer Befunde an der Gesamtzahl der im klinischen Follow-Up tatsächlich nachgewiesenen malignen Erkrankungen:

$$\text{Sensitivität} = A / (A + B)$$

Die **Spezifität** gibt den Anteil richtig negativ gestellter zytologischer Befunde an der Gesamtzahl klinisch bestätigter nicht maligner Erkrankungen an. Es ist also die Fähigkeit des Tests, klinisch nicht maligne Erkrankungen auch als solche zu erkennen.

$$\text{Spezifität} = D / (C + D)$$

Der **positive Prädiktionswert** (*positive predictive value*, PPV) bezeichnet den Anteil zytologisch richtig positiver Befunde, an der Anzahl aller als maligne erkrankt bezeichneter Patienten. Dieser Test prüft also wie wahrscheinlich es ist, dass das positive Ergebnis auch richtig ist.

$$\text{PPV} = A / (A + C)$$

Der **negative Prädiktionswert** (*negative predictive value*, NPV) gibt den Anteil richtig negativer Befunde an der Gesamtheit aller negativen Befundergebnisse wieder. Es zeigt also wie wahrscheinlich es ist, dass der Patient tatsächlich nicht an einer malignen Erkrankung leidet, wenn das Testergebnis dieses nahelegt.

$$\text{NPV} = B / (B + D)$$

Die **Gesamttrefferlichkeit** (G) ist der Anteil aller richtig positiv und richtig negativ erkannten Diagnosen an der Gesamtheit aller Fälle.

$$G = (A + D) / (A + B + C + D)$$

2.4.3 Definition der Evidenzlevel

Die verschiedenen Methoden, die zur Verfügung standen um die liquorzytologische Befundung zu überprüfen, konnten diese entweder bestätigen oder falsifizieren. Jede dieser Methoden hat klinisch eine unterschiedliche Aussagekraft. Je mehr Untersuchungsmethoden die Zytodiagnose bestätigen und je höher das bestätigende Verfahren in der Wertigkeit steht, desto höher ist auch die Aussagekraft des

entsprechenden Zytobefundes. Folglich kann also eine heterogene Kombination von "Prüfinstanzen" entstehen, die in unterschiedlicher Anzahl oder Aussagekraft den Zytobefund bewerten. Aus diesem Grunde wurden für statistische Arbeiten dieser Art eine Reihe von Evidenzleveln festgelegt, welche jeweils ein Indikator für die Aussagekraft eines Testverfahrens sind. Hier im Einzelnen der liquorzytologischen Befunde.

Die Evidenzlevel wurden nach dem Certainty-Faktor (Sobin et al, 2010) sowie in Anlehnung an frühere Doktorarbeiten (Bölefahr, 2011; Dannenberg, 2014; Haastert, 2014) aus dem Funktionsbereich Cytopathologie der Universität Düsseldorf definiert.

Definition von richtig/falsch positiven zytologischen Diagnosen

Evidenzlevel 1

Die Diagnose im Arztbrief (positiv) ist übereinstimmend mit der zytologischen Diagnose. Es wurden keine weiteren diagnostischen Maßnahmen zur Überprüfung ergriffen („richtig positiv“).

Die negative Diagnose im Arztbrief widerspricht der zytologischen Diagnose. Es erfolgte keine weitere diagnostische Absicherung des klinischen Befundes („falsch positiv“).

Evidenzlevel 2

Aus dem Arztbrief geht eine übereinstimmende positive Diagnose hervor. Zusätzlich wird die Diagnose mit dem klinischen Follow-Up bestätigt („richtig positiv“).

Aus dem Arztbrief geht eine vom zytologischen Befund abweichende negative Diagnose hervor. Die Ätiologie des punktierten Geschehens wurde geklärt („falsch positiv“).

Evidenzlevel 3

Ein weiterer im Verlauf erfolgter zytologischer Befund fällt positiv aus und bestätigt die Erstbefundung („richtig positiv“).

Das negative Ergebnis einer erneuten zytologischen Untersuchung widerspricht dem ursprünglichen zytologischen Befund („falsch positiv“).

Evidenzlevel 4

Bildgebende Verfahren wie: Sonographie, Röntgen oder Szintigraphie bestätigen die positive zytologische Diagnose („richtig positiv“) oder kommen zu einem widersprüchlichen Befund („falsch positiv“).

Evidenzlevel 5

Ein MRT/CT bestätigt die positive zytologische Diagnose („richtig positiv“) oder entkräftet diese durch eine abweichende Diagnose („falsch positiv“).

Evidenzlevel 6

Ein histologisches Gutachten nach einer Biopsie des verdächtigen Herdes bestätigt die positive zytologische Diagnose („richtig positiv“).

Die histologische Untersuchung kommt zu einem widersprüchlichen negativen Ergebnis („falsch positiv“).

Definition von richtig negativen bzw. falsch negativen zytologischen Diagnosen

Evidenzlevel 1

Der abschließende Befund im Arztbrief fällt positiv aus und widerspricht somit der zytologischen Diagnose. Es wurden keine weiteren Untersuchungen veranlasst („falsch negativ“).

Aus dem klinischen Follow-Up steht kein weiterer Befund dem zytologischen Gutachten entgegen. Die Dignität des Befundes wurde im Arztbrief als "ungeklärt" eingestuft. Die zytologische Diagnose wird vom Kliniker übernommen („richtig negativ“).

Evidenzlevel 2

Der abschließende Befund im Arztbrief ist positiv und entkräftet die zytologische Diagnose. Durch bildgebende Verfahren (Sonographie/Szintigraphie) oder weitere zytologische Untersuchungen wird der positive Befund im Arztbrief zusätzlich bestätigt („falsch negativ“).

Im Arztbrief wird der Befund als "ungeklärt" bezeichnet, jedoch wird die zytologische Diagnose von weiteren zytologischen oder histologischen Gutachten bestätigt („richtig negativ“).

Evidenzlevel 3

Der suspekte Prozess wird im Arztbrief als positiv bezeichnet und durch CT/MRT bestätigt. Die negative zytologische Diagnose wird somit widerlegt („falsch negativ“).

Der Befund wird im Arztbrief als gutartig eingestuft und widerspricht dem zytologischen Befund nicht („richtig negativ“).

Evidenzlevel 4

Der Befund wird im Arztbrief als positiv eingestuft und wird durch ein histologisches Gutachten bestätigt. Der negative zytologische Befund wird damit entkräftet („falsch negativ“).

Der Prozess wurde im Arztbrief als "ungeklärt" eingestuft, jedoch untermauern weitere diagnostische Verfahren wie erneute Zytologie, Histologie, Sonographie, Röntgen, CT oder MRT den zytologischen Befund und/oder die zytologische Diagnose durch mehrjähriges negatives Follow-Up („richtig negativ“).

3. Ergebnisse

3.1 Studienaufbau

Einen Überblick über die Fallrekrutierung der Studie bietet das vorliegende Flussdiagramm in Abbildung 11.

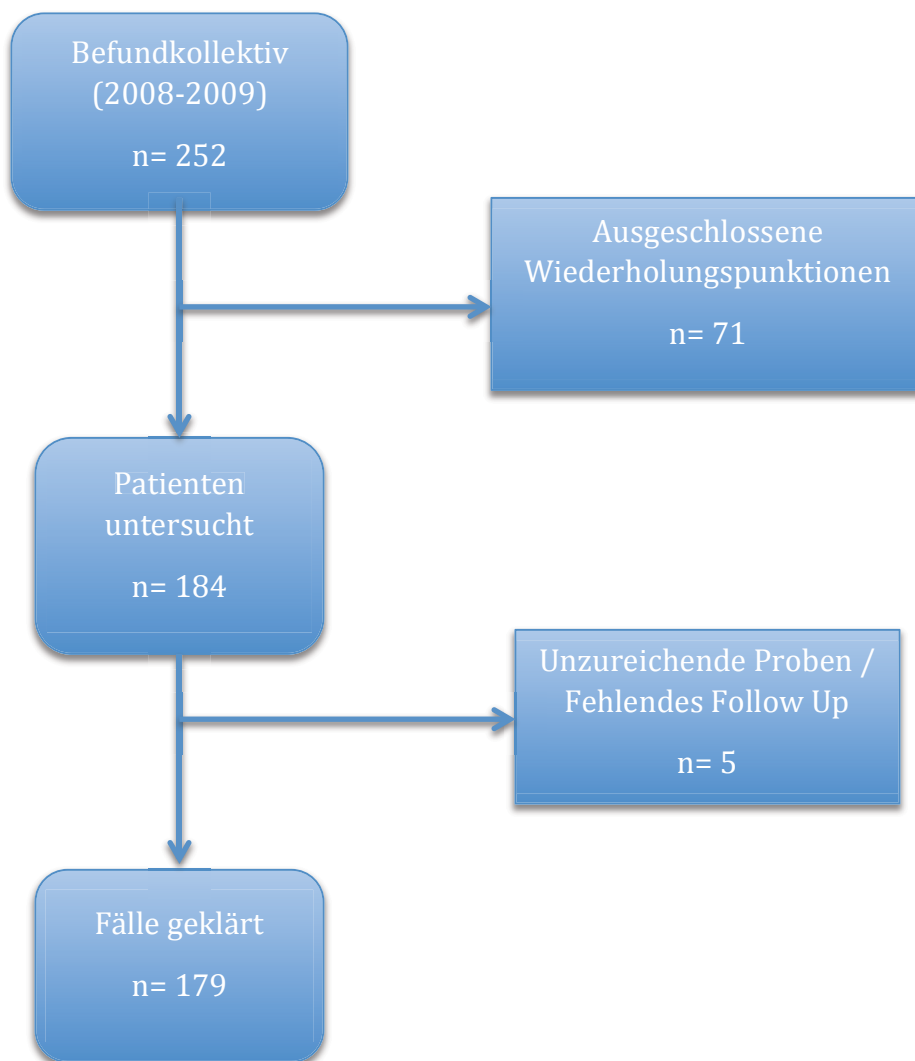


Abb. 11: Flussdiagramm zur Fallrekrutierung in der Studie zur Treffsicherheit der Liquorzytologie

3.2 Kategorien liquorzytologischer Befunde

Auf Grundlage der 179 untersuchten Patientenfälle, konnten die Ergebnisse zytologischer Gutachten nach Böcking und Freudenberg in die vier Befundkategorien negativ, zweifelhaft, dringender Verdacht und positiv eingeteilt werden (Böcking, 1998). Die Gesamtverteilung aller zytologischen Befunde sowie ihre Überprüfung im Verlauf der klinischen Diagnosekette, wird in Abbildung 12 dargestellt.

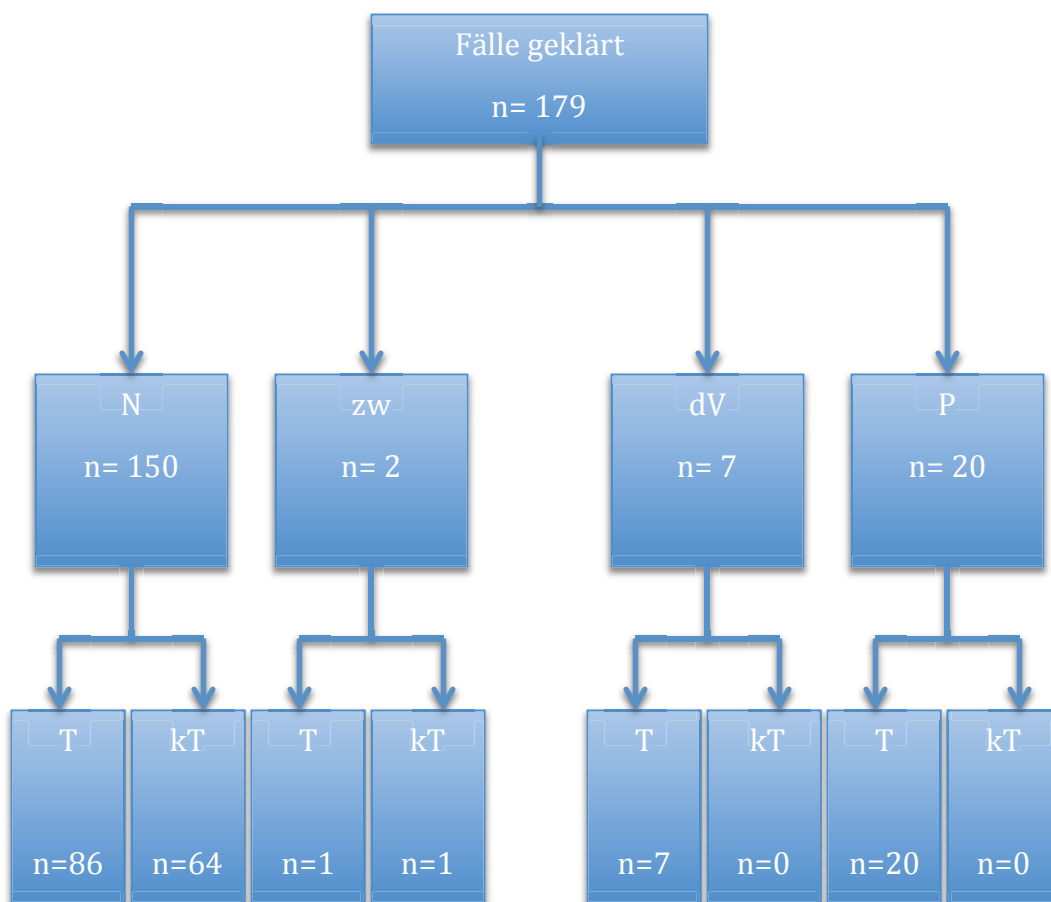


Abb. 12: Flussdiagramm zu den Diagnosen der 179 Liquorfälle. Diagnostik: . zw = zweifelhaft, dV = dringender Verdacht. Klinischer Verlauf: kt = kein Tumor, T = Tumor

3.2.1 „Tumorzell-negative“ Fälle

An der Gesamtheit aller 179 untersuchten Fälle machen die „Tumorzell-negativen“ Fälle mit einer Anzahl von 150 den Großteil der zytologischen Befundergebnisse aus. Sie haben somit einen relativen Anteil von 83,8%.

Durch das klinische Follow-Up konnte festgestellt werden, dass von den 150 als „Tumorzell-negativ“ klassifizierten Fälle 64 Fälle tatsächlich als klinisch negativ eingestuft werden konnten. Der Anteil richtig negativer Fälle betrug also 42,6%. In 86 klinisch als positiv interpretierten Fällen wurden keine Tumorzellen nachgewiesen (57,4%).

3.2.2 „Zweifelhafte“ Fälle

Als „zweifelhaft“ wurden in der vorliegenden Studie zwei Fälle eingestuft. Bezogen auf die Gesamtzahl der 179 Fälle entspricht dieses 1,1%. Nach Auswertung der Follow-Up Daten wurde ermittelt, dass ein zweifelhafter Fall (50%) klinisch negativ war, während der andere Fall als klinisch positiv eingestuft wurde (50%).

3.2.3 „Dringend verdächtige“ Fälle

Insgesamt wurden in dieser Studie sieben Fälle als „dringend verdächtig“ klassifiziert. Dies macht in Bezug auf die Gesamtzahl von 179 Fällen einen relativen Anteil von 3,9% aus. Nach Auswertung des Follow-Ups konnte festgestellt werden, dass in allen „dringend verdächtigen“ Fällen eine maligne Tumordiagnose gestellt werden konnte (100%).

3.2.4 „Tumorzell-positive“ Fälle

Die zytologische Auswertung der Patientenfälle ergab eine Anzahl von 20 „Tumorzell-positiven“ Diagnosen. An der Gesamtheit aller 179 Fälle beträgt ihr Anteil 11,2%. Die Auswertung des klinischen Follow-Ups ergab, dass alle in dieser Kategorie eingestuften Befunde eine maligne Tumordiagnose aufwiesen (100%).

3.3 Statistische Auswertung

3.3.1 Kenndaten zur klinischen und zytologischen Diagnostik

Die ermittelten Ergebnisse der Befundklassifizierung wurden mittels einer Vier-Felder Tafel statistisch ausgewertet. Dargestellt wird hierbei die Verteilung der absoluten Häufigkeiten in Tabelle 2. Aus dieser lassen sich Kenndaten wie Sensitivität, Spezifität und Gesamttreffer sicherheit, bezogen auf das klinische Endergebnis, ableiten. Dabei wurden zytologisch zweifelhafte Diagnosen als negativ gewertet, solche mit dringendem Verdacht als positiv.

Klinische Diagnose	Liquorzytologische Diagnose		Summe
	+	-	
+	27	87	114
-	0	65	65
Summe	27	152	179

Tab. 2: Verteilung der absoluten Häufigkeiten der Diagnosen

Eine klinisch bestätigte maligne Erkrankung in Gehirn oder Rückenmarksraum lag bei 114 von 179 Patienten vor, was einen Anteil von 63,7% ausmacht. Von der liquorzytologischen Untersuchung wurden 27 dieser Fälle als „richtig positiv“ (23,7%) und 87 als „falsch negativ“ eingestuft (76,3%).

Eine bestätigte negative Diagnose wiesen 65 Fälle auf, was einen Anteil am auswertbaren Gesamtpool von 36,3% ausmacht. Im Falle der bestätigten negativen Diagnosen konnte die Liquorzytologie diese Fälle auch als „richtig negativ“ erkennen (100%).

Die Sensitivität beträgt formal somit 23,7% (27/114), die Spezifität 100% (65/65). Der positive Prädiktionswert des untersuchten Verfahrens liegt bei 100% (27/27), der negative Prädiktionswert bei 42,8% (65/152). Die Gesamttreffer sicherheit, die das Verhältnis zwischen der Anzahl aller richtig gestellten Diagnosen (92 Fälle) und der Anzahl aller untersuchten Patienten (179 Fälle) angibt, ergibt 51,4%.

Die übersichtliche Darstellung der statistischen Auswertung wird in der Tabelle 3 wie folgt zusammengefasst:

Statistische Kenndaten	Wert
Sensitivität	23,7 %
Spezifität	100 %
Positiver Prädiktionswert	100 %
Negativer Prädiktionswert	42,7 %
Falsch positiv Rate	0 %
Falsch negativ Rate	76,3 %
Gesamttrefferlichkeit	51,4 %

Tab. 3: Darstellung der statistischen Kenndaten

3.3.2 Auswertung nach Evidenzleveln

Neben der quantitativen Beurteilung der zytologischen Gutachten mittels Kennzahlen der Trefferlichkeit soll auch eine qualitative Einordnung der Befunde erfolgen. Die Kategorisierung erfolgt hierbei gemäß den Evidenzleveln. Hierdurch wird die Aussagekraft der einzelnen Befunde im Kontext mit anderen Untersuchungsverfahren (klinisch, histologisch oder bildgebend) beurteilt. Je aussagekräftiger die Verfahren sind, mit dem man einen zytologischen Befund untermauert, desto sicherer ist dessen Aussage zu werten. Gleiches gilt auch für die Falsifizierung eines zytologischen Befundes.

Die positiven zytologischen Befunde werden abgestuft in den Evidenzleveln 1-6 einsortiert, wobei das Evidenzlevel 6 die höchste Aussagekraft hat. Bei den zytologischen Gutachten, die eine negative Diagnose zum Ergebnis hatten, werden zur Überprüfung vier Evidenzlevel zugrunde gelegt (EL 1-4). Die Einteilung der einzelnen Befunde in Evidenzlevel wird in Tabelle 4 dargestellt.

Evidenzlevel	Positive Zytodiagnosen	Negative Zytodiagnosen
EL 1	0	16
EL 2	4	13
EL 3	1	64
EL 4	0	59
EL 5	12	-
EL 6	10	-
Summe	27	152

Tab. 4: Einteilung der zytologischen Diagnosen bezogen auf Evidenzlevel

Sowohl bei den positiven, als auch bei den negativen Diagnosen wird ersichtlich, dass die meisten Befunde den höchsten Evidenzleveln zugeordnet wurden. Für die richtig eingestuften Gutachten zeugt dies von einer hohen Zuverlässigkeit der zytologischen Untersuchungen. Die große Anzahl an Befunden in höheren Evidenzleveln belegt, dass die Gesamtheit der Fälle klinischerseits mit einem hohen Aufwand untersucht wurde.

Betrachtet man die falsch negativ bzw. falsch zweifelhaft klassifizierten Fälle dieser Studie, erkennt man, dass etwa die Hälfte von ihnen ein Evidenzlevel bis 3 und die andere Hälfte ein Evidenzlevel 4 aufwiesen (Tabelle 5).

Evidenzlevel	Falsch negative Zytodiagnosen	Falsch zweifelhafte Zytodiagnosen
EL 1	13	1
EL 2	11	0
EL 3	20	0
EL 4	42	0
Summe	86	1

Tab. 5: Einteilung der falsch klassifizierten Diagnosen nach Evidenzleveln

3.3.3 Klinische Diagnoseeinteilung

Um eine Übersicht aller im klinischen Verlauf gestellten Diagnosen zu erhalten, wurden nach Auswertung der zytologischen Gutachten und des klinischen Follow-Ups die definitiven Diagnosen in Kategorien eingeteilt. Eine allgemeine Kategorisierung der verwandten Krankheitsbilder in größere Gruppen bietet einen groben Überblick der gesamten Patientenpopulation in dieser Studie. Eine geschlechterspezifische Darstellung bietet Abbildung 13.

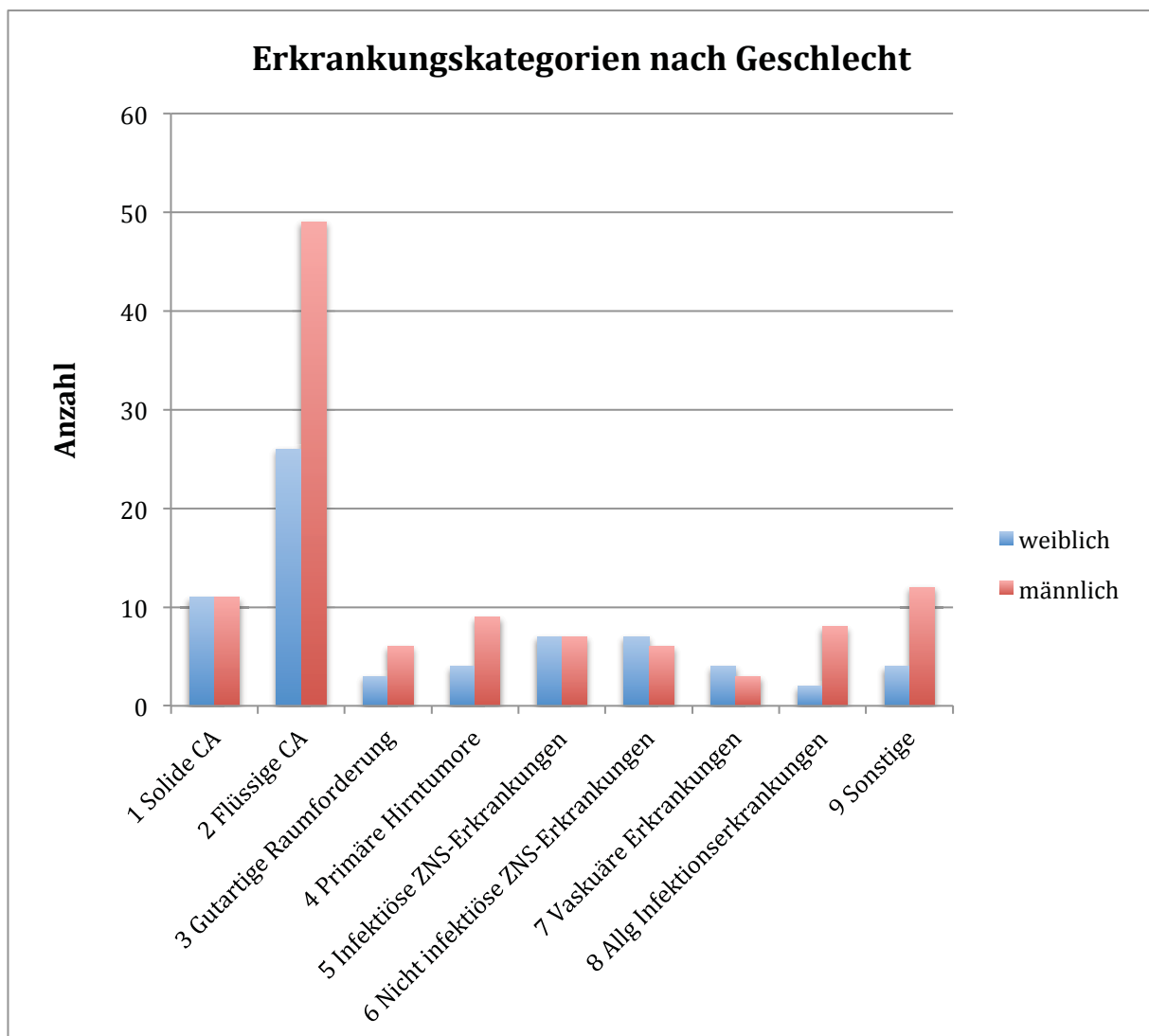


Abb. 13: Geschlechterspezifische Einteilung in allgemeine Erkrankungskategorien

3.3.4 Kategorisierung und Ursachen der definitiven Diagnosen

3.3.4.1 Nicht maligne Diagnosen

Nach Auswertung aller zur Verfügung stehenden Krankenakten zu den jeweiligen Patienten betrug die Anzahl von negativen Diagnosen 65 (36,3%). Von diesen entfallen 24 auf weibliche Patienten (37,5 %) und 41 (62,5 %) auf männliche Patienten. Eine Unterteilung der Ursachen der negativ diagnostizierten Fälle erfolgte in acht Gruppen, zwischen welchen sich Überschneidungen nicht immer vermeiden ließen.

HIV Begleiterkrankungen

Aufgrund länger bestehender oder auch kürzlich diagnostizierter Infektion mit dem HI-Virus kommt es zu diversen konsekutiven Erkrankungen wie beispielsweise Neuroloues als Manifestation einer Begleitinfektion mit Treponema Pallidum, Myelopathien oder diversen entzündlichen Geschehen. Diese Erkrankungen werden der Übersicht halber aufgrund der zugrunde liegenden Gemeinsamkeit einer HIV Infektion in die Gruppe der HIV-Begleiterkrankungen zusammengefasst und beinhalten in der Auswertung vorliegender Patientendaten eine Anzahl von insgesamt acht Patienten.

Entzündlich

Die größte Gruppe der nicht malignen Diagnosen mit 18 diagnostizierten Fällen stellen die allgemeinen entzündlichen Erkrankungen, wobei die Enzephalitis auch als Folge anderer zugrunde liegender Erkrankungen den Hauptteil ausmacht. Ursachen für Entzündungen sind jedoch meist bakterielle oder virale Infektionen.

Idiopathisch

Als idiopathisch werden Veränderungen eingestuft, deren Ursache trotz diverser Nachforschungen nicht geklärt werden konnte. Dies war in dieser Arbeit bei sieben Patienten der Fall.

Infektiöse Grunderkrankung

Länger bestehende oder neu diagnostizierte Infektionserkrankungen wie Tuberkulose oder eine Infektion mit dem HI-Virus. Diese Fälle können trotz eindeutiger klinischer Symptombilder eine große diagnostische Herausforderung darstellen, da sie in manchen Fällen auch eine maligne Erkrankung vortäuschen bzw. auch maskieren können (Assi et al., 2015). Insgesamt wurden fünf Patienten nach Auswertung der vorliegenden klinischen Daten in diese Gruppe eingestuft.

Neurologisch

Als Ursache für veränderte Liquorzellbilder werden in dieser Gruppe primär nicht-entzündliche neurologische Krankheitsbilder wie Demenz, Parkinson oder M. Menière zusammengefasst. Eine strenge Beurteilung aller Kriterien ist von immenser Wichtigkeit, da maligne Erkrankungen entsprechende Symptomkonstellationen hervorrufen können, die typischen neurologischen Erkrankungen ähneln und es somit zu einer Fehlinterpretation kommen kann. In der klinischen Diagnosefindung kommt daher der Neurologie eine sehr wichtige Rolle zu. Als Fälle mit nicht entzündlicher, neurologischer Erkrankung wurden fünf männliche und eine weibliche Patientin eingestuft.

Nicht-tumoröse Raumforderungen

Raumfordernde nicht-tumoröse Ursachen können sowohl innerhalb als auch außerhalb des zentralen Nervensystems auftreten. In zwei Fällen wurde die Diagnose eines Hydrozephalus gestellt, während jeweils einmal ein Pseudotumor cerebri, eine Kolloidalzyste am Foramen Monroi sowie eine unklare mediastinale Raumforderung festgestellt wurden.

Therapieerfolg

Eine wichtige Gruppe der nicht malignen Diagnosen stellen diejenigen Patienten, bei denen eine erfolgte Therapie zur vollständigen Remission der Erkrankung geführt hat. Die zugrunde liegende Erkrankung kann im Anschluss weder mittels Liquorzytologie

noch klinisch-bildgebend festgestellt werden. Insgesamt sieben Fälle wurden in diese Kategorie eingeordnet.

Vaskulär

Als Ursache für veränderte Liquorzellbilder kommen zerebrale Ischämien, Aneurysmen oder aber traumatische Ereignisse wie eine Subarachnoidalblutung nach Sturz. Dies sind nur Beispiele vaskulärer Ereignisse, welche das ZNS betreffen und sich in diversen anderen Ausprägungen zeigen können. Zwei Fälle von Ischämie, zwei Aneurysmen, ein Infarkt, eine Subarachnoidalblutung, eine Vaskulitis sowie ein Fall vom Churg-Strauss-Syndrom setzen somit diese Gruppe in der vorliegenden Studie mit insgesamt acht Fällen zusammen.

Eine Übersicht der geschlechterspezifischen Ursacheneinteilung nicht maligner Diagnosen aus dieser Studie gibt Abbildung 14.

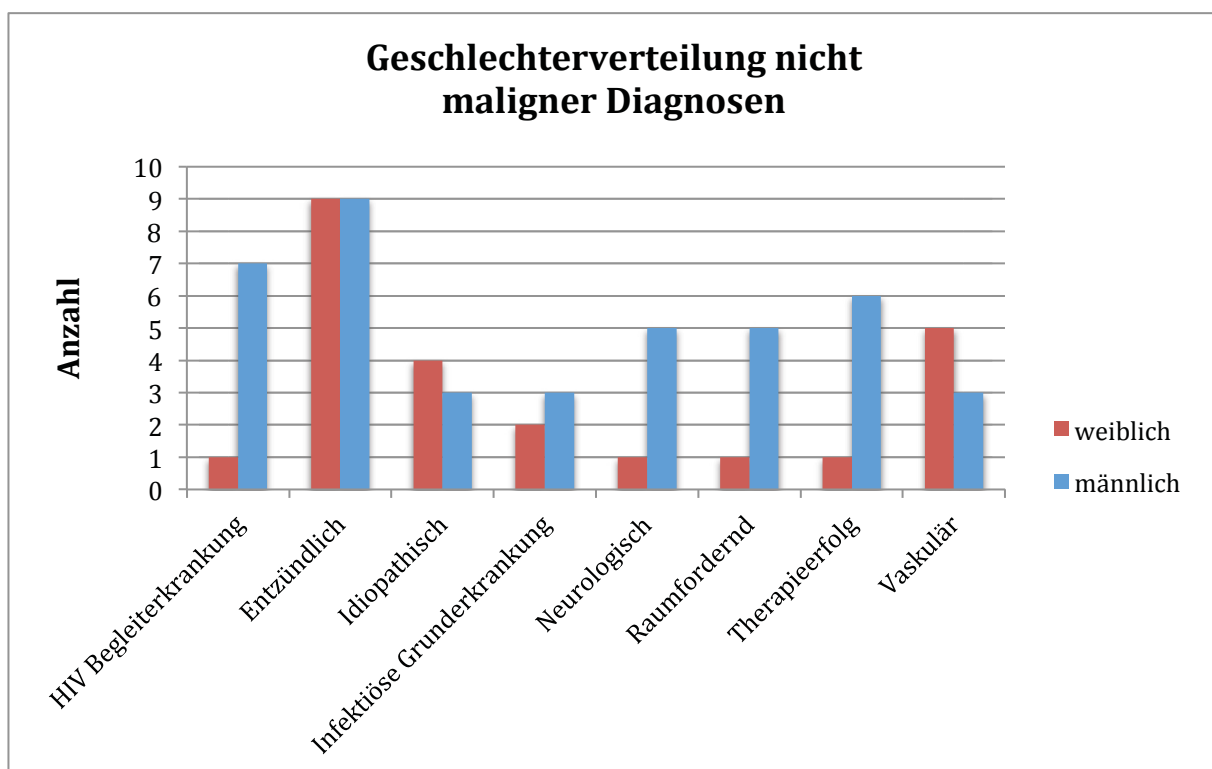


Abb. 14: Geschlechterspezifische Darstellung der Ursachen nicht maligner definitiver Diagnosen

3.3.4.2 Maligne Diagnosen

Nach Auswertung des klinischen Follow-Ups aller Patientendaten stellte sich eine Anzahl von 114 Patienten heraus mit einer im Verlauf diagnostizierten malignen Erkrankung im Sinne von Karzinosen, Lymphomen, Leukämien oder primären Hirntumoren. Dies entspricht annähernd zwei Dritteln der 179 statistisch auswertbaren Patientenfälle (63,7%). Von den 114 klinisch positiven Diagnosen entfallen 70 Fälle auf männliche Patienten, 44 auf weibliche.

Die diagnostizierten Malignome lassen sich in sieben Gruppen zusammenstellen:

Non-Hodgkin-Lymphome

Innerhalb der 45 malignen Non-Hodgkin-Lymphome stellte die Gruppe der B-Zell Lymphome mit 42 gestellten klinischen Diagnosen den weitaus größten Anteil. In die Kategorie der B-Zell Lymphome fallen Erkrankungen wie follikuläres Lymphom, Burkitt-Lymphom, MALT-Lymphom, lymphoblastisches Lymphom und weitere. Im Vergleich zu den B-Zell-Lymphomen kamen T-Zell Lymphome mit drei Fällen als Vertreter maligner Erkrankungen deutlich seltener vor. Ein Beispiel hierfür ist die Diagnose des lymphoblastischen Vorläufer T-Zell Lymphoms.

Leukämie

Hauptvertreter der sogenannten „flüssigen Malignome“, welche in dieser Studie in 20 Fällen diagnostiziert worden waren, sind die Leukämien. Mit jeweils neun Fällen wurden die akute myeloische Leukämie und die akute lymphatische Leukämie festgestellt, während die chronische myeloische Leukämie bei zwei Patienten diagnostiziert wurde.

Mammakarzinom

Das Mammakarzinom kam bei neun von 68 weiblichen Patienten vor, was in dieser Gruppe einen Anteil von ca. 11,7% ausmacht.

Magenkarzinom

Im gesamten Patientenpool der vorliegenden Arbeit trat das Magenkarzinom nur bei den männlichen Patienten mit einer Anzahl von drei Fällen auf.

Bronchialkarzinom

In der Auswertung unserer Patientendaten fanden sich insgesamt sieben Fälle von Lungenkrebs, wobei geschlechterspezifisch eine ungleiche Verteilung auffiel. Von den sieben nachgewiesenen Fällen litten sechs Männer und eine Frau am Bronchialkarzinom.

Primärtumoren des zentralen Nervensystems

Die am häufigsten aufgetretene Tumorart dieser Patientengruppe ist das Glioblastom mit acht festgestellten Fällen. Das Astrozytom trat bei drei Patienten auf, während das Medulloblastom zwei Mal diagnostiziert wurde. Jeweils einmal gingen folgende Tumorarten in die Statistik: Germinom, atypischer teratoider Tumor, Ependymom, Prolaktinom sowie der Keimzelltumor der Pinealisregion. Somit wurde insgesamt in 18 Fällen ein Primärtumor des zentralen Nervensystems diagnostiziert.

Sonstige

In der Kategorie der „sonstigen“ malignen Erkrankungen wurden Diagnosen eingestuft, welche im Verlauf der Studie nur selten oder vereinzelt vorkamen. Drei Fälle von Nierenzellkarzinomen, drei maligne Melanome sowie zwei myelodysplastische Syndrome wurden diagnostiziert und in diese Kategorie eingestuft. Darüber hinaus gab es jeweils einzelne Fälle von folgenden Erkrankungen: Mastozytose, Ovarialkarzinom, Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und Poems-Syndrom. Die Anzahl der in diese Gruppe kategorisierten Patienten beläuft sich somit auf 12.

Eine geschlechterspezifische Verteilung maligner Diagnosen gibt Abbildung 15 wieder.

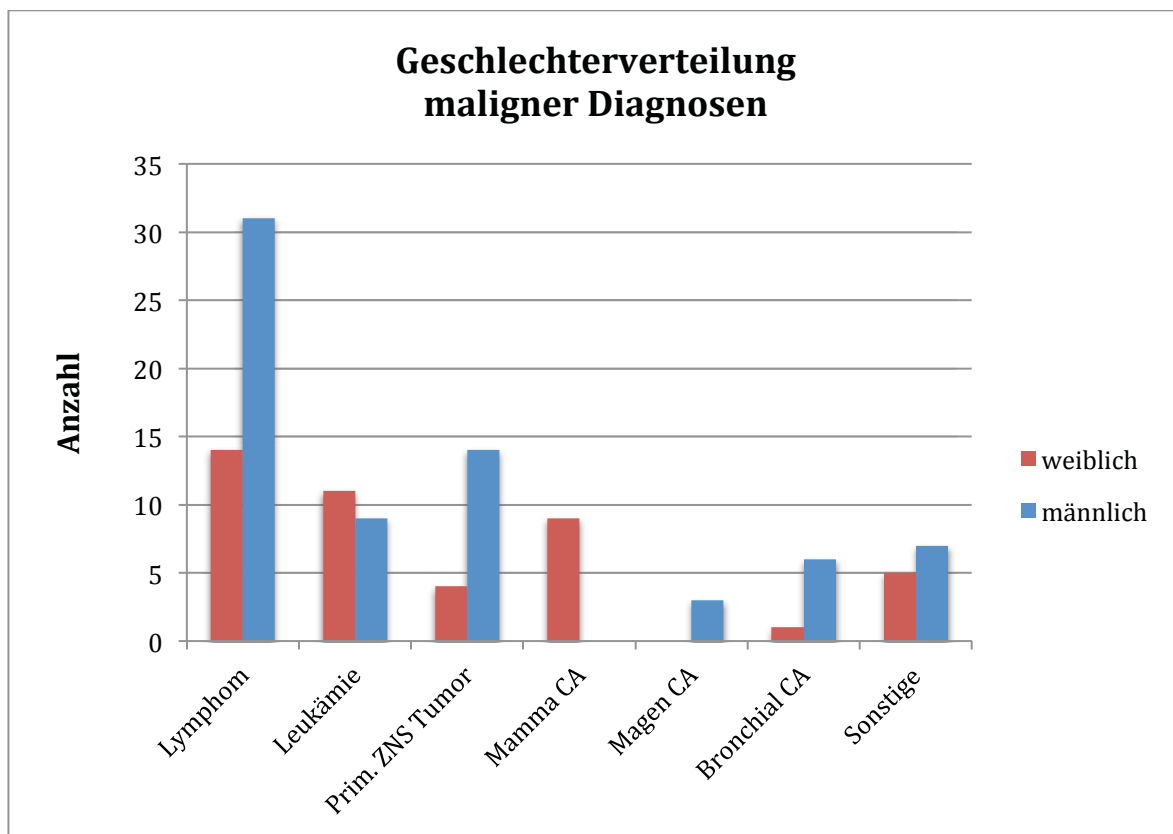


Abb. 15: Geschlechterspezifische Darstellung maligner definitiver Diagnosen

In Tabelle 6 sind die einzelnen Tumordiagnosen noch einmal in Zahlen detailliert für beide Geschlechter wiedergegeben.

Diagnose	Anzahl	Männer	Frauen	Anteil (M)	Anteil (F)	Anteil (%)
B NHL	32	20	12	28,6	27,3	28,1
ALL	9	4	5	5,7	11,4	7,9
AML	9	3	6	4,3	13,6	7,9
Burkitt Lymphom	9	7	2	10	4,5	7,9
Glioblastom	8	4	4	5,7	9	7

Tab. 6 (Anfang): Geschlechterspezifische prozentuale Verteilung maligner klinischer Diagnosen

Diagnose	Anzahl	Männer	Frauen	Anteil (M)	Anteil (F)	Anteil (%)
Mammakarzinom	9	0	9	0	20,5	7
Bronchialkarzinom	7	6	1	8,6	2,3	6,1
Astrozytom	3	3	0	4,3	0	2,6
Nierenzellkarzinom	3	2	1	2,9	2,3	2,6
Magenkarzinom	3	3	0	4,3	0	2,6
Mal. Melanom	3	1	2	1,4	4,5	2,6
T Zell Lymphom	3	3	0	4,3	0	2,6
CML	2	2	0	2,9	0	1,7
MDS	2	2	0	2,9	0	1,7
Medulloblastom	2	2	0	2,9	0	1,8
Ependymom	1	1	0	1,4	0	0,9
Germinom	1	1	0	1,4	0	0,9
Keimzelltumor der Pinealisregion	1	1	0	1,4	0	0,9
MALT-Lymphom	1	1	0	1,4	0	0,9
Mastozytose	1	0	1	0	2,3	0,9
Ovarial CA	1	0	1	0	2,3	0,9
PEC	1	1	0	1,4	0	0,9
Prolaktinom	1	1	0	1,4	0	0,9
POEMS	1	1	0	1,4	0	0,9
Atypischer teratoid- rhabdoider Tumor	1	1	0	1,4	0	0,9
Gesamt	114	70	44	100%	100%	100%

Tab. 6 (Fortsetzung): Geschlechterspezifische prozentuale Verteilung maligner klinischer Diagnosen

4. Diskussion

Eine große Anzahl an Erkrankungen, ob maligne oder benigne, zeigt charakteristische Veränderungen im Liquor cerebrospinalis in Form von entzündlichen Pleozytosen oder suspekten bzw. atypischen Zellen und Zellverbänden und machen somit diese Körperflüssigkeit zu einem wertvollen und wichtigen Diagnostikum. Die Interpretation der Abweichung vom Normalen bzw. die Beurteilung unüblicher Zellvorkommnisse in den inneren oder äußeren Liquorräumen ist seit der Entwicklung der Liquorzytologie immer Bestandteil klinischer Diagnosefindung gewesen. Aus der Kombination der Zellbildveränderungen mit den neurologischen Symptomen der Patienten können nicht selten wegweisende Erkenntnisse in der Diagnostik gewonnen werden. Diverse neurologische Auffälligkeiten ergeben im Zusammenhang mit bestimmten Liquorbefunden entsprechende Muster, welche einer spezifischen Verdachtsdiagnose zugeordnet werden können. Ziel der Liquordiagnostik ist es daher, diagnostische Hilfestellung zu leisten oder ggfls. auch eine Schlüsselrolle in der Diagnosekette zu übernehmen.

Die Wertigkeit und Aussagekraft der Liquorzytologie am eigenen Krankengut zu bestimmen, war das Hauptziel der vorliegenden Studie. Neben der Bestimmung ihres aktuellen Stellenwertes in der Diagnostik sollten auch Schwachstellen ermittelt werden, um mögliche Verbesserungen in der aktuellen Vorgehensweise möglich zu machen.

4.1 Liquorzytologie in der Tumordiagnostik: Eine Methode mit hoher Spezifität und eingeschränkter Sensitivität

Das Hauptaugenmerk der morphologischen Fächer und somit auch dieser Arbeit liegt auf der Detektion von Tumorzellen. Dieses hat vor allem damit zu tun, dass andere Fächer, seien es die bildgebenden Disziplinen wie Nuklearmedizin, Radiologie und Neuroradiologie oder die klinischen Fächer wie Onkologie, Neurologie oder Neurochirurgie, zwar tumortypische Symptome darstellen können. Es steht ihnen aber keine Methode zur wirklichen Tumorsicherung zur Verfügung, abgesehen möglicherweise von der Durchflusszytometrie bei der Diagnostik von Leukämien oder Lymphomen im Liquorraum. Ansonsten ist ein Rundherd in einem bildgebenden Verfahren oder ein klinisches Hirndruckzeichen auch bei bekannten Tumorpatienten zwar ein wichtiges

und schwerwiegendes Indiz, aber kein echter Beleg für eine Ausbreitung eines Tumorleidens in das Gehirn, sondern kann auch biologisch gutartig begründet sein, z.B. durch Abszesse oder Infarkte. Andererseits ist die Aussagekraft der Liquorzytologie bezogen auf gutartige Erkrankungen eingeschränkt, wenn man von der bakteriellen Meningitis mit ihrem massiv granulozytär betonten Bild absieht. Die Zytologie spielt aber bei dieser Verdachtsdiagnose nur eine untergeordnete Rolle; entscheidend sind die Klinik und die mikrobiologische Diagnostik (Pfister et al., 2015).

Wenn nun die Stärke der Zytopathologie in der Tumorzelldetektion bestehen soll, so sind Anforderungen an diese Untersuchung zu formulieren. Üblicherweise wünscht man sich eine hohe Sensitivität und eine hohe Spezifität, um möglichst wenige falsch negative bzw. falsch positive Diagnosen zu stellen. Da positive Diagnosen oftmals relativ zügig und ohne Rückfragen in Therapie umgesetzt werden, muss insbesondere nach dem wichtigen medizinischen Prinzip des *nil nocere* das Risiko falsch positiver Diagnosen im Blick behalten werden.

Stellt man die Treffsicherheit der Liquorzytologie nun anhand der verfügbaren Quellen (Baehring et al., 2006; Straathof et al., 1999; Subirá et al., 2015, Bommer et al., 2011) in den Gesamtzusammenhang anderer zytologischer Entnahmen, so schneidet sie auf dem Gebiet der Spezifität ähnlich gut ab wie andere Anwendungen auch. Nicht nur in unserer Studie ließ sich eine Spezifität von 100% darstellen; auch die oben genannten anderen Arbeiten belegen ähnliche Werte. Im Vergleich mit häufigen Anwendungen, z.B. Ergusspunktionen seröser Höhlen (Pleuraerguss, Perikarderguss, Aszites), Bronchialzytologie oder Harnwegszytologie, sind somit im Grunde identische Werte erreichbar. Eine Studie aus unserer Einrichtung an Perikardpunktaten konnte kürzlich zeigen, dass anhand von 456 Patienten die Perikardzytologie eine Spezifität von 97,0% aufweist (Dannenberg, 2014). Motherby et al. (1999) konnten anhand von Untersuchungen der allgemeinen Ergusszytologie belegen, dass die Spezifität bei Pleuraergüssen 97% und bei Aszites 98% beträgt. Eine aktuelle Studie von Fink (2015) an 1437 Patienten bescheinigt bei Pleuraergüssen unter Berücksichtigung adjuvanter Methoden wiederum eine Spezifität von 100%. Letztendlich lassen sich falsch positive Diagnosen somit fast immer vermeiden, solange man die Organsystem-typischen *pitfalls* kennt und beachtet.

Anders sieht es mit der Sensitivität aus. Während für Ergusspunktate Werte von bis zu 81% erreichbar sind (Ceelen, 1964), für Perikardergüsse sogar bis 85,5% (Dannenberg, 2014), liegt der Liquor in neueren Studien mit einer Sensitivität von 27% (Baehring et al., 2006) über 41,3% (Bae et al., 2013) bis hin zu 73% (Bommer et al., 2011) deutlich niedriger, wobei die Ergebnisse von Baehring und Bommer mit Vorsicht zu betrachten sind, da ein gewisser Bias nicht auszuschließen ist. Lee et al. (2015) berichten über eine Sensitivität bei Erstpunktaten von 50%. Auch wenn einzelne ältere Studien über Werte von 71% (Kaplan et al., 1990) bis zu 75% (Balm und Hammack, 1996) berichten, so gibt es im Grunde keine gängige zytologische Anwendung, die so wenige richtig positive Diagnosen ermöglicht wie die Liquorzytologie.

4.2 Einflussgrößen auf die Treffsicherheit der Liquorzytologie: *sampling error*, *screening error* und *clinical error*

Da die Spezifität der Liquorzytologie sehr hoch und somit unbedenklich ist, soll die Besprechung der Einflussgrößen, auch wenn sie theoretisch Auswirkungen auf die Spezifität haben könnte, vorwiegend auf die Sensitivität als eigentlich kritischer Größe bezogen werden. Die Fehlerquellen, die zu einer irrtümlichen Einordnung eines morphologischen Befundes führen, sind dabei für histologische und zytologische Untersuchungen prinzipiell die gleichen und gliedern sich klassischerweise in *sampling error* und *screening error*. Für den Liquorraum sollen sie hier um einen *clinical error* ergänzt werden.

Sampling error

Alle Formen des *sampling error* betreffen Aspekte der Gewinnung oder Verarbeitung der Probe.

Schon zu Beginn des Diagnoseprozesses können Fehler entstehen, und zwar bei der Probenentnahme. Hier sollte vermieden werden, den Liquor mit frischem Blut zu kontaminieren und damit indirekt zu verdünnen, was allerdings nicht immer gelingt. Außerdem sollte eine möglichst große Menge Liquor, soweit klinisch vertretbar, gewonnen werden. Man weiß aus anderen Anwendungen (Ergüsse, Urin), dass die zu

erreichende Zelldichte nach Zellanreicherung durch Zentrifugation etc. auch in gewisser Weise mit der Materialmenge korreliert. Dies gilt auch für den oft besonders zellarmen Liquor (Koss und Melamed, 2006), wobei dem Zytopathologen klar sein muss, dass eine Entnahme von größeren Mengen von Liquor in aller Regel nicht möglich sein wird. Während Urinflüssigkeiten (1:1 mit Alkohol verdünnt) und Ergussflüssigkeiten (nativ) oft 50-100 ml umfassen, beschränken sich Liquorproben eher auf 1 - 5 ml. In unserer Studie lagen in denjenigen Fällen, in denen die Liquormenge im Befund dokumentiert waren, Liquorvolumina zwischen 3 ml und 5 ml vor.

Ein anderer wichtiger Punkt, der zu einem *sampling error* führen kann, ist eine verzögerte Übergabe der Probe an das Labor. Unfixierter Liquor ist nämlich eine Flüssigkeit, die nur in einem kurzen Zeitfenster mit guten präparatorischen Ergebnissen verarbeitet werden kann. Dieses wird üblicherweise mit 1 - 2 Stunden angegeben (Torzewski et al., 2008) und kann auch nicht, anders als beispielsweise bei unfixierten Körperhöhlenergüssen, durch Lagerung im Kühlschrank verlängert werden. Wird das Zeitfenster wesentlich überschritten, so müssen qualitative Abstriche an den Präparaten durch Autolyse oder Zelldegeneration in Kauf genommen werden. In Düsseldorf erfolgt die Weitergabe von Liquorproben üblicherweise zügig, sodass in der Regel ein guter Zellerhalt angenommen werden darf.

Im zytologischen Labor wiederum geht es darum, eine gute Zellanreicherung zu erreichen und Präparate zu gewinnen, die ausreichend zelldicht und ohne morphologische Artefakte sind. Die klassische schonende Zellanreicherung mittels Sedimentationsverfahren nach Sayk (1954) wird teilweise heutzutage noch verwendet, wurde aber zumeist durch die Zellanreicherung mit Zytozentrifugen abgelöst (Kluge et al., 2005). In ihrer Studie zur zytologischen Liquoranalyse konnten Potemowski et al. (1995) zeigen, dass die Zytozentrifugation der Sedimentation überlegen ist. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der Zellanreicherung mittels Filtertechnik. In der Cytopathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf wird ein Zytozentrifugationsverfahren angewandt, in welchem die angereicherten Zellen auf einem im Durchmesser ca. 8 mm großen Bezirk eines Objektträgers aufgebracht werden (vgl. Abb. 10). Die Flüssigkeit, die mit auf den Objektträger gelangt, soll zügig über ein randlich anlagernes Filterpapier abgeführt werden, um Quellungen der Zellen zu vermeiden. Dies gelingt

aus Erfahrung in aller Regel gut; in geschätzt 5% der Fälle ist aber eine gewisse Quellung der Zellen zu beobachten. Diese muss die Beurteilbarkeit der Zellen nicht unmöglich machen, erschwert sie aber.

Screening error

Auch beim *screening error* sind verschiedene Arten der Fehlerentstehung zu unterscheiden.

Zum einen kann es sein, dass bei der zytologischen Beurteilung relevante Zellen übersehen werden, beispielsweise wenn der Befunder unter Zeitdruck gerät oder wenn er ermüdet ist. Eine solche Situation wird allerdings bei Präparaten wie Urin oder Liquor, die nur auf einen Teil des Objektträgers zentrifugiert werden und die deswegen mit geringem zeitlichen Aufwand gescreent werden können, nur selten auftreten. Bei anderen Präparationsarten, bei denen komplette Objektträger im Mikroskop mäanderförmig durchgeschaut werden müssen, beispielsweise bei Ausstrichpräparaten aus der gynäkologischen Zytologie, könnte ein derartiger *screening error* vergleichsweise häufiger sein.

Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die relevanten Zellen zwar gesehen, aber nicht richtig eingeordnet werden. Dieses liegt daran, dass die Morphologie verschiedener Zellarten durchaus recht ähnlich sein kann. Im Liquor könnte beispielsweise die Abgrenzung von Tumorzellen eines gut differenzierten Karzinoms mit entsprechend nur geringen zytologischen Abweichungen von der Norm gegenüber Histiozyten oder Ependymzellen schwierig sein. Pyknotische Tumorzellen können in Größe und Morphologie auch lymphoiden Zellen ähneln, die häufig dem Liquor untermischt sind. Geht es als drittes Beispiel um die Frage einer Infiltration der Liquorräume durch eine chronisch-lymphatische Leukämie (CLL), so wäre auch hier bei nur geringer Tumoralast die Abgrenzung gegenüber ortstypischen Lymphozyten möglicherweise schwierig. Hier liegt ein sicher wichtiges Problemfeld, das sich zum Teil wohl durch die ergänzende Anwendung von Immunzytochemie und Durchflusszytometrie verringern lassen könnte, ggfls. auch in kombinierten Ansätzen beider Methoden (Lee et al., 2015). Geringer

differenzierte Karzinome und high-grade-Lymphome sollten keine Schwierigkeiten bereiten.

Clinical error

Die dritte Fehlerquelle hat keinen fachtechnischen Namen und könnte analog als *clinical error* bezeichnet werden. Sie dürfte aus der Erfahrung mit dieser Studie beim Liquor bedeutender sein als bei anderen zytologischen Präparaten. Es geht dabei um die Frage, was ein Fall, an dem man die Treffsicherheit einer Methode bestimmen möchte, „wirklich“ ist: positiv oder negativ. Nur wenn diese Entscheidung richtig getroffen worden ist, wird auch die Diagnose, die es zu bewerten gilt, korrekt beurteilt. Beim Liquor ist die klinische Einordnung mancher Fälle besonders diffizil. So muss z.B. lange nicht jede bewiesene Hirnmetastase Anschluss an den Liquorraum haben, was aber im Einzelfall formal solange nicht bewiesen werden kann, wie nicht ein positiver Zytologiebefund auftritt. Es ist dann schwer und kann sogar unmöglich sein, aufgrund anderer klinischer oder bildgebender Daten zu bestimmen, ob der Liquor Tumorzellen enthält oder nicht. Denkbar wäre auch ein Szenario, bei dem bei bewiesener Hirnmetastase der Liquor in einer prätherapeutischen Zytologie positiv war, dann aber durch eine Chemotherapie negativ wird und bei einer danach entnommenen Zytologie (richtig) negativ ist, obwohl der bildgebend nachweisbare raumfordernde Prozess noch besteht. Andererseits ist aber auch eine Situation vorstellbar, bei der ein Tumorpatient ohne eine solide Hirnraumforderung neurologische Auffälligkeiten zeigt; auch hier stellt sich die Frage, wie man dann ohne einen positiven zytologischen Befund eine entzündliche meningeale Reizung von einer Meningeosis carcinomatosa zweifelsfrei abgrenzen soll.

Zusammenspiel der drei Fehlerquellen in der Diagnostik

Inwieweit die einzelnen Fehlerquellen ineinander greifen, ist unseres Wissens nicht systematisch untersucht und wohl auch nicht untersuchbar. Geschätzt wird, dass (den bislang wenig beachteten *clinical error* außer Acht gelassen) ca. zwei Drittel von Fehlinterpretationen auf einem *sampling error* und ca. ein Drittel auf einem *screening error* beruhen. Die einzige Publikation, die am Beispiel der gynäkologischen Zytologie hierzu konkrete Zahlenangaben macht, bezieht sich auf 70 falsch-negative Diagnosen,

von denen 58,5% auf einen *screening error*, 38,6% auf einen *sampling error* und 2,9% auf einen dort *interpretation error* genannten Faktor zurückgeführt wurden (Pairwuti 1991). Falsch-positive Diagnosen wurden dort nicht untersucht.

4.3 Erwartungswerte an die Treffsicherheit der Liquorzytologie bei epithelialen Tumoren

Einen besonderen Einblick in die Limitationen der Liquorzytologie bei Karzinomen bietet eine Arbeit aus Südkorea aus dem Jahr 2013 (Bae et al. 2013), die im Folgenden genauer besprochen werden soll. In der Studie wurden 385 Liquorproben von 42 Patienten mit einer histologisch oder zytologisch nachgewiesenen Hirnmetastasierung ausgewertet, darunter 40 mit Karzinomen und zwei mit malignen Melanomen.

Die Liquorentnahmen, im Durchschnitt neun pro Patient, erfolgten bei anhaltendem Hirndruck und übermäßiger Liquorproduktion aus Liquorreservoirs von dauerhaft eingebrachten Ventrikelkathetern (Abbildung 16).

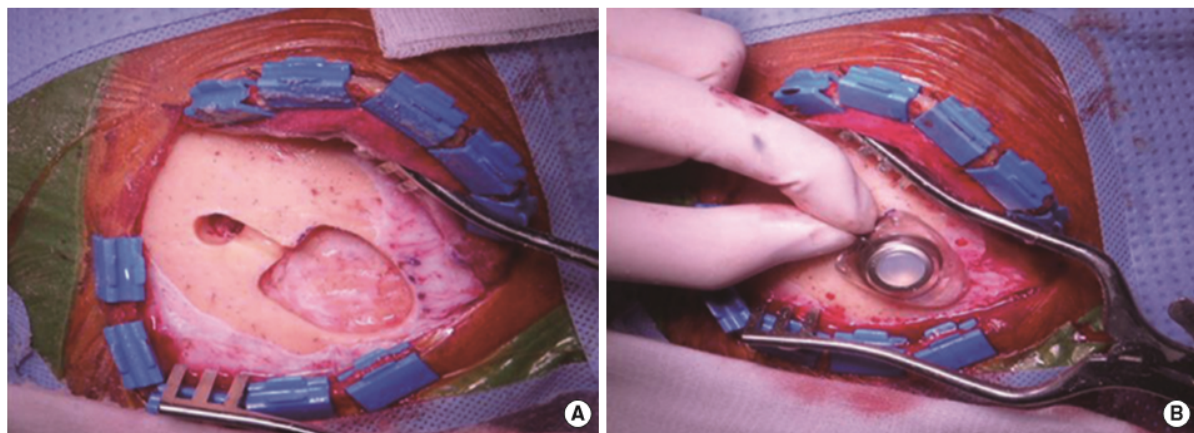


Abb. 16: Operationssitus während der Einbringung eines Ventrikelkatheters zur späteren Liquorableitung bzw. -gewinnung (aus: Bae et al., 2013)

Sie wurden als Papanicolaou-gefärbte zytologische Sedimente aufgearbeitet, ergänzt um eine Immunzytochemie mit einem der gebräuchlichen Pan-Zytokeratin-Gemische, nämlich AE1/AE3. Liquorproben mit morphologisch verdächtigen Zellen und / oder Nachweis von AE1/AE3-positiven Zellen wurden als Tumorzell-positiv interpretiert. Insgesamt waren 226 der Proben negativ (58,7%), 159 hingegen positiv (41,3%), sodass

selbst bei bewiesenen, nicht nur vermuteten Hirnmetastasen und im Grunde „unbegrenzter“ Entnahmemöglichkeit die Sensitivität der Liquorzytologie bei nur gut 40% lag. Innerhalb der 42 Fälle schwankte sie zwischen 0% und 100%.

An zwei in der Arbeit tabellarisch dokumentierten Fällen (Fall 4 und Fall 12), jeweils mit einer Meningeosis carcinomatosa bei Adenokarzinom der Lunge, lässt sich gut demonstrieren, wie die Ergebnisse von liquorzytologischen Untersuchungen innerhalb von zwei Monaten von Entnahme zu Entnahme variieren können (Abbildung 17).

Dabei sprechen die Ergebnisse insbesondere von Fall 12 mit einem Auf und Ab von positiven und negativen Proben für einen *sampling error*, während in Fall 4, wo gerade zum Ende hin negative Ergebnisse überwiegen, nicht ausgeschlossen werden kann, dass Therapieeffekte eine Rolle spielen könnten. Leider gibt die Arbeit über therapeutische Ansätze, z.B. über intrathekale Chemotherapien, keine Aufschlüsse. Besonders hervorzuheben wäre auch, dass in Fall 4 Proben vom gleichen Tag (Entnahmen 8 und 9) zu diskrepanten Ergebnissen geführt haben.

Case No. 4	Cytological diagnosis	Date	Case No. 12	Cytological diagnosis	Date
1	Negative for malignancy	Oct 20, 2010	1	Positive for malignancy	Feb 5, 2013
2	Positive for malignancy	Oct 23, 2010	2	Positive for malignancy	Feb 15, 2013
3	Negative for malignancy	Oct 30, 2010	3	Negative for malignancy	Feb 25, 2013
4	Positive for malignancy	Nov 2, 2010	4	Positive for malignancy	Feb 27, 2013
5	Positive for malignancy	Nov 8, 2010	5	Positive for malignancy	Mar 5, 2013
6	Negative for malignancy	Nov 10, 2010	6	Positive for malignancy	Mar 6, 2013
7	Suspicious for malignancy	Nov 23, 2010	7	Negative for malignancy	Mar 12, 2013
8	Positive for malignancy	Nov 24, 2010	8	Positive for malignancy	Mar 14, 2013
9	Negative for malignancy	Nov 24, 2010	9	Positive for malignancy	Mar 18, 2013
10	Negative for malignancy	Dec 1, 2010	10	Negative for malignancy	Mar 21, 2013
11	Suspicious for malignancy	Dec 3, 2010	11	Positive for malignancy	Mar 26, 2013
12	Negative for malignancy	Dec 9, 2010	12	Negative for malignancy	Mar 27, 2013
13	Negative for malignancy	Dec 16, 2010	13	Positive for malignancy	Mar 29, 2013
			14	Negative for malignancy	Apr 2, 2013
			15	Positive for malignancy	Apr 3, 2013

Abb. 17: Tabellarische Darstellung von liquorzytologischen Untersuchungen bei zwei Patienten („Fall 4“ bzw. „Fall 12“) über jeweils ca. zwei Monate (aus: Bae et al., 2013). Als „*suspicious*“ beurteilte Proben wurden in der statistischen Auswertung der Studie als „positiv“ berücksichtigt.

Verdichtet man die Ergebnisse nur auf Fälle mit mindestens fünf Beobachtungen, so verbleiben auf 350 Entnahmen 212 negative Ergebnisse und 138 positive Ergebnisse, was erneut einer Sensitivität von etwa 40% entspricht.

Zusammenfassend lässt sich aus dieser Arbeit ablesen, wie vielschichtig die Probleme der Liquorzytologie, bezogen auf die Sensitivität der Untersuchung, selbst bei belegt positiven Fällen sind, gerade auch wenn man eine longitudinale zeitliche Komponente mit einbezieht. Letztendlich darf man offenbar keine sehr hohen Sensitivitätswerte erwarten, selbst unter Hinzunahme der Immunzytochemie mit einem Pan-Zytokeratin. Wie viel diese adjuvante Methode konkret gebracht hat, lässt sich aus der Studie wiederum nicht ablesen, da sie auf diesen Aspekt nicht eingeht.

In Anbetracht dieser Studie stellt sich die grundsätzliche Frage, ob der Liquor cerebrospinalis als Diagnostikum überhaupt Sensitivitätswerte in der Größenordnung anderer zytologischer Anwendungen erreichen kann. Die Studienlage zum Liquor liefert ohnehin schon deutlich diskrepante Ergebnisse zur Sensitivität. Entsprechend muss man sich bei Studien mit besonders hoher Treffsicherheit fragen, ob sich in ihnen bzw. in ihrer Interpretationsweise eventuell ein möglicher Bias verborgen liegt, der zu deutlich höheren Werten führt. Dies gilt im Besonderen für die Behandlung von „zweifelhaften“ oder anderweitig „verdächtigen“ Befunden, die in manchen Studien als „positiv“, in anderen als „negativ“ gewertet werden. So gilt beispielsweise für die am Ende von Kapitel 4.1 genannten Arbeiten von Baehring et al. (2006) und von Bommer et al. (2011), dass in der erstgenannten Arbeit (nach deutschsprachigen Gesichtspunkten) abnorme² und verdächtige Zellen in die negativen Befunde eingeordnet werden, während in der letztgenannten Arbeit abnorme Zellen als negativ und suspekta als positiv eingestuft werden (Canovi und Campioli, 2016). Letzten Endes schlagen sich „Lockerungen“ in der Diagnosezuordnung immer zweiseitig nieder, nämlich in einem

² Die Verwendung der Begriffe „abnorm“ und „atypisch“ ist im deutschsprachigen und im englischsprachigen Sprachraum gegenläufig. „Abnorme Zellen“ bezeichnen nur geringe Abweichungen von der Norm und sind „atypical“, während „atypische Zellen“ mit bereits klarer tumorweisenden zytologischen Eigenschaften zu den „abnormals“ gehören.

bestimmten Einfluss auf die Sensitivität und einem gegenteiligen Effekt auf die Spezifität.

Durchflusszytometrische Ansätze setzen im Moment auf Techniken der Zellanreicherung und der simultanen Markierung als epitheliale Zellen durch einen EPCAM-Antikörper. In einer Studie an 102 Proben von 38 Patientinnen mit Mammakarzinomen ließ sich dabei zeigen, dass bei Tumor-positiven Fällen eine erhöhte Zahl EPCAM-positiver Zellen (Median: 110,3 / ml) im Vergleich zu Tumor-negativen Fällen (Median: 0,3 / ml) vorlag; allerdings gab es Überschneidungen zwischen beiden Gruppen. So wurden in der Tumor-negativen Gruppen auch immerhin bis zu 14,3 EPCAM-positive Zellen pro Milliliter nachgewiesen (Lee et al., 2015). Ferner war in zwei von 28 in der Zytologie positiven Fällen keine Zunahme EPCAM-positiver Zellen nachweisbar, was belegt, dass die Durchflusszytometrie die Zytologie nicht ersetzt, sondern beide Methoden als komplementär angesehen werden sollten. Mit beiden Methoden kamen auch Fälle vor, die als verdächtig, aber nicht eindeutig entscheidbar angesehen wurden.

In einer anderen Arbeit an allerdings nur 13 Tumor-positiven Fällen gelang es hingegen in einem gleichartigen Ansatz, alle Fälle durchflusszytometrisch nach EPCAM-Markierung und Zellanreicherung zu identifizieren, während das in der konventionellen Zytologie nur in acht Fällen (61,5%) gelang (Milojkovic Kerklaan et al., 2016).

Während diese beiden Arbeiten über eine Spezifität von 100% für die durchflusszytometrische Analyse und die Liquorzytologie berichteten, wiesen Subirá et al. (2015) nach vergleichenden Untersuchungen an 72 Fällen von Patienten mit Meningeosis carcinomatosa auf eine wesentlich geringere Spezifität der durchflusszytometrischen Analyse (84% vs. 100% der Zytologie) hin, konnten allerdings gleichzeitig eine höhere Sensitivität (79,8% vs. 50%) bestätigen.

Denkbar und sinnvoll könnte also sein, beide Methoden komplementär einzusetzen bzw. in Fällen, in denen die Liquorzytologie trotz begründeten Tumorverdacht nicht zu einem positiven Ergebnis führt, die Durchflusszytometrie in einem zweiten Schritt einzusetzen.

4.4 Erwartungswerte an die Treffsicherheit der Liquorzytologie von malignen Lymphomen und Leukämien

Ein weiterer wichtiger Faktor, der zu unterschiedlichen Ergebnissen führt, ist, dass manche Studien sich auf die Liquordiagnostik spezifischer Erkrankungsgruppen konzentriert und dabei nicht die gesamte Bandbreite maligner und nicht maligner Diagnosen einbezieht.

In der Auswertung unserer Studie wurde beispielsweise deutlich, dass die Liquordiagnostik der Lymphome eine eindeutig niedrigere Treffsicherheit aufweist als die der Karzinosen. In Abbildung 18 ist die Verteilung der falsch negativen Diagnosen und der richtig positiven Diagnosen vergleichend zu Karzinosen und sonstigen Erkrankungen wiedergegeben. Sie zeigt, dass eben insbesondere bei den malignen Lymphomen keine Tumorzellidentifikation gelang, was in erster Linie auf das Problem des *clinical error* zurückgehen dürfte.

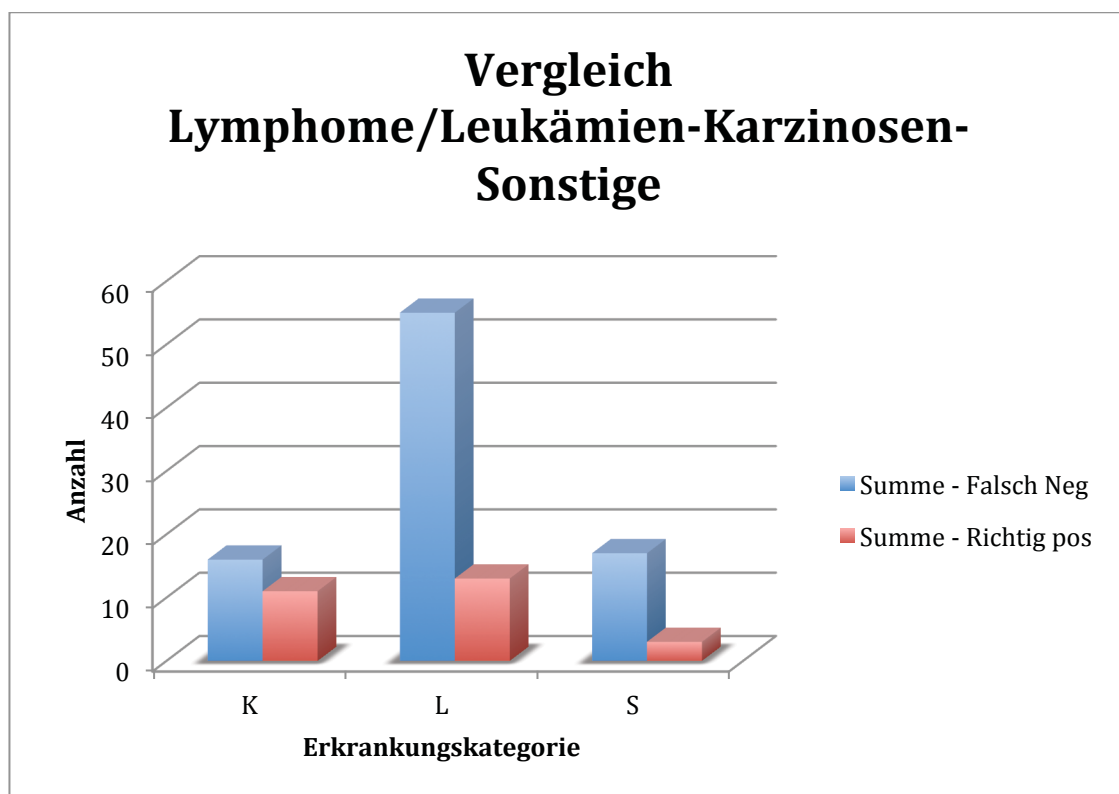


Abb. 18: Darstellung formal falsch negativer und richtig positiver Ergebnisse für unterschiedliche Erkrankungskategorien; K=Karzinosen, L=Lymphome, S=Sonstige

Während man erwarten kann, dass Tumorzellen von Karzinomen morphologisch auffallen, muss dieses bei malignen Lymphomen und Leukämien nicht unbedingt der Fall sein. Das hat damit zu tun, dass lymphoide Zellen wie Lymphozyten oder Monozyten sowie auch Granulozyten in geringer Zahl in vielen Liquorproben nachweisbar sind und in nicht wenigen Proben vermehrt auftreten. Darüber hinaus sind auch sogenannte „Reizformen“ möglich, also gutartige lymphoide oder monozytäre Zellen, ggfls. auch linksverschobene myeloische Zellen wie z.B. Stabkernige oder sogenannte Jugendliche, wenn ein Entzündungsprozess länger besteht und protrahiert verläuft. Solche Zellen sind oft größer, verfügen über ein aufgelockertes Chromatin und zeigen auch Mitosen, sodass die Abgrenzung gegenüber neoplastischen Zellen der identischen Reihen erschwert ist. Die Erkennung maligner Lymphome und ebenso myeloischer Systemerkrankungen ist somit *à priori* schwieriger.

Dieses schlägt sich auch in den zu erwartenden Treffsicherheiten nieder, die in einem aktuellen Review zu diesem Thema dargestellt wurden (Canovi und Campioli, 2016). Dort wurden in einer systematischen Literaturrecherche 27 Arbeiten aus den Jahren 1998 bis 2015 ausgewertet und tabellarisch dargestellt, denen gleich war, dass neben der konventionellen Zytologie auch mit Durchflusszytometrie gearbeitet wurde. Ansonsten unterschieden sich die Arbeiten methodologisch deutlich („*basically no article is similar to one another pertaining study methods*“). So waren die zu berücksichtigenden konkreten Erkrankungen von Studie zu Studie sehr unterschiedlich. Manche Arbeiten schlossen Rezidive ein, andere nicht. Oft wurde aus den Arbeiten eine Formulierung wie „*from patients with suspected CNS involvement*“ angegeben, sodass anders als in der Studie von Bae et al. (2013) das Problemfeld des *clinical error* in die Daten hineinspielt. Außerdem waren Patientenkollektive darunter, in denen nur ein Liquor pro Patient untersucht wurde, sowie solche, in denen es mehrere waren. Bezogen auf die aufaddierten Gesamtdaten lässt sich sagen, dass von 3248 Proben 244 positiv waren (7,5%), 2933 negativ (90,3%) und 71 unklar („*indeterminate*“, 2,2%). Lässt man die größte Studie, die 990 Proben stellt und somit 30,5% der Beobachtungen umfasst, weg, da sie ggfls. einen nicht beherrschbaren Bias bedingen könnte, so verschieben sich die Ergebnisse nur wenig. Von den verbleibenden 2258 Proben waren 241 positiv (10,7%), 1946 negativ (86,2%) und 71 unklar (3,1%).

Beide Rechenmodelle zeigen übereinstimmend, dass bei Fällen mit Verdacht auf Ausdehnung von Leukämien und Lymphomen in den Liquorraum mit der Liquorzytologie nur selten beweisende Tumorzellen nachgewiesen werden können. Nur in drei der 27 Studien wurden aufgrund vorliegender klinisch-bildgebender Befunde Angaben zur Treffsicherheit gemacht. Die Sensitivität wurde mit 27% - 75% angegeben, die Spezifität mit 90% - 100% (Subirá et al., 2015, Baehring et al., 2006, Bommer et al., 2011). Dass die Erkennung von malignen Lymphomen schwierig bleibt, hat sicher auch etwas damit zu tun, dass bis heute keine klaren Kriterien für die Differenzierung zwischen entzündlich-reaktiven und neoplastischen lymphatischen Zellen entwickelt werden konnten, worauf vor einiger Zeit noch einmal überzeugend in einer morphologisch geprägten Arbeit mit dem selbst erklärenden Titel „*CSF cytology - the ongoing dilemma to distinguish neoplastic and inflammatory lymphocytes*“ hingewiesen wurde (Perske et al., 2011).

4.5 Beurteilung eigener Ergebnisse in der Tumordiagnostik

Im Zuge der Aufarbeitung der liquorzytologischen Gutachten anhand des klinischen Follow-Up stellte sich an unseren 252 Fällen heraus, dass in 114 der als klinisch positiv eingeordneten Fälle in 27 Tumorzellen nachgewiesen wurden (23,7%), während alle 138 Fälle, die als klinisch negativ klassifiziert waren, keine Tumorzellen aufwiesen; Letzteres entspricht einer Spezifität von 100%. Nimmt man die klinischen Diagnosen als jeweils richtig an, so lag der positive Prädiktionswert bei 100% und der negative Prädiktionswert bei 43,7%, die Gesamttreffsicherheit bei 51,4 %. Falsch positive Diagnosen konnten also vollständig vermieden werden, während der Anteil richtig positive Diagnosen relativ niedrig war. Dabei zeigte sich auch, dass die Liquordiagnostik der Lymphome und Leukämien eine eindeutig niedrigere Treffsicherheit aufwies als die der Karzinome, was in erster Linie auf das Problem des *clinical error* zurückgehen dürfte. Die Zahlenangaben beziehen sich dabei auf die im Kapitel „Material und Methoden“ angegebenen Definitionen für die Erkennung bzw. den Ausschluss von Malignität und sollen im Folgenden diskutiert werden.

Geht man von den oben angesprochenen drei Fehlermöglichkeiten aus, so erscheint aus Sicht der Düsseldorfer Cytopathologie der *screening error* am wenigsten die geringere

Sensitivität zu erklären. Aktuelle Untersuchungen aus der Einrichtung an gynäkologischen Abstrichen, Bronchialzytologien, Pleuraflüssigkeiten, Aszites, Perikardflüssigkeiten und Nebennierenzytologien belegen (vgl. Kap. 4.1), dass die Treffsicherheiten hierfür sich jeweils mit denjenigen anderer zytologischer Einrichtungen gut messen können (Motherby et al., 1999; Dannenberg, 2014; Born, 2016; Kuppuswamy, 2017). Dass man bei im Grunde stets ähnlichen Kriterien zur Detektion auffälliger Zellen, wie sie oben auch für den Liquor genannt wurden (Torzewski et al., 2008), bei einer von vielen anderen Anwendungen auf einmal die entsprechenden Zellen nicht fände, klingt wenig realistisch.

Anders könnte es mit den Themen des *sampling error* und des *clinical error* aussehen.

Beim *sampling error* geht es vor allem darum, wie umfangreich man ein Material untersucht, wobei die Zielgröße aller Überlegungen die Zahl angesehener Zellen und deren morphologische Qualität ist. Die Zahl angesehener Zellen zu optimieren, kann über mehrere Methoden gelingen. Dabei spielt sicher die Art des Zentrifugations- bzw. Sedimentationsverfahrens eine Rolle, das aber beim Liquor immer einen Kompromiss zwischen der Zellzahl und der Vulnerabilität der Zellen bedeutet. Erfahrungsgemäß ist eine stärkere Zentrifugation zwar geeignet, die Zellzahl auf dem Objektträger zu erhöhen, aber nicht immer dem Ziel dienlich, gut beurteilbare Zellen zu erhalten. Zentrifugiert man zu stark auf eine zu kleine Fläche des Objektträgers, so können die Zellen am Ende auch zu dicht liegen, wie dieses manchmal bei sehr zellreichen Urinen, z.B. bei bakterieller Entzündung mit starker Anreicherung von Granulozyten, vorkommt. Geschieht der über das die Zentrifugationsfläche umgebende Filterpapier stattfindende Wasserentzug zu schnell oder zu langsam, leidet ebenfalls das morphologische Bild durch Quellung bzw. Schrumpfung insbesondere der Zellkerne. Unter all diesen Überlegungen müssen SOPs definiert und eingehalten werden, die allen Gegebenheiten Rechnung tragen.

Möglich wäre hingegen, die Zahl der untersuchten Präparate zu erhöhen. Hier sehen die SOPs in Düsseldorf vor, einen oder zwei Objektträger, je nach Materialmenge, mit der Routinefärbung MGG zu färben und die übrigen Objektträger, deren Zahl bei Anfertigung von einem Objektträger pro 0,5 ml Liquor durchaus schwanken kann, ungefärbt zu lassen. Hintergrund ist, dass im Falle eines Tumor-positiven Befundes noch Präparate

für eine eventuelle Immunzytochemie zur Verfügung stehen sollen und dieses an MGG-vorgefärbten Präparaten bislang technisch nicht möglich ist. Eine nachträgliche Färbung dieser Präparate bei eindeutig Tumor-negativem Befund wird allerdings nicht regelhaft vorgenommen, sondern nur, wenn sich zumindest ein gewisser Verdacht auf Zellauffälligkeiten erheben lässt. Hier läge ein möglicher Ansatz zur Verbesserung der Diagnostik. Durch die nachträgliche Färbung weiterer Präparate ließe sich möglicherweise eine größere diagnostische Sicherheit erreichen, auch wenn die Diagnostik selber sich damit über einen längeren Zeitraum erstrecken würde. In welchem Maße eine Liquoraufarbeitung in anderen Einrichtungen vorgenommen wird, lässt sich bei kritischer Durchsicht aus den Angaben, die in wissenschaftlichen Veröffentlichungen im Kapitel „Material und Methoden“ gemacht werden, in der Regel leider nicht ablesen. Dass man eine Zunahme an positiven Ergebnissen in der Liquorzytologie prinzipiell erreichen kann, zeigen Daten aus einer Arbeit von Balm und Hammack (1996), die über eine Steigerung von 75% über 92% auf 94% bei drei nach einander untersuchten Proben berichteten, allerdings bezogen auf nur wenige Patienten.

Eine andere Form des *sampling error* könnte die Frage betreffen, ob selbst bei bewiesener Präsenz von Tumorzellen im Liquorraum diese in einer oder mehreren Liquorproben vorkommen müssen. Darauf, dass dieses nicht immer der Fall sein muss, wurde bereits vor fast 40 Jahren anhand eines Einzelfalles hingewiesen (Glass et al., 1979). Bei diesem fand wenige Tage nach mehreren zytologisch negativen Liquorproben die Obduktion des inzwischen verstorbenen Patienten statt, bei der sich ein eindeutiger und ausgiebiger Befall des Liquorraumes durch Tumorzellen eines Adenokarzinoms der Lunge zeigte. Allerdings erklärt dieses Phänomen nicht, weswegen sich Zahlen zur Sensitivität von einer Studie zur anderen stark unterscheiden.

Ein besonderes Problem stellt in der Beurteilung der Liquorzytologie die notwendige korrekte Zuordnung der Fälle zu Grunderkrankungen dar, aus welcher sich im Zweifelsfall ein *clinical error* ableiten lassen könnte. Unsere eigene Beschäftigung mit diesem Thema zeigt, dass es vielfach wirklich schwierig ist, eine Zuordnung zu treffen, die allen klinischen, bildgebenden und morphologischen Gegebenheiten gerecht wird. Nicht wenige Fälle stellen sich dabei als komplizierter heraus, als man das selber vorher

gedacht hat, gerade wenn auch klinisch-bildgebend keine klare Einordnung, sondern nur eine Diagnose auf der Basis von Wahrscheinlichkeiten vorliegt.

Im Folgenden sollen zur Verdeutlichung der Zuordnungsschwierigkeiten vier Fälle von Tumorkranken, die einen negativen Liquorbefund hatten, exemplarisch dargestellt werden.

Patientin 2: Unbehandeltes disseminiertes Burkitt-Lymphom

Eine 28-jährige Patientin, die nach einem 10-tägigen Aufenthalt in einem peripheren Krankenhaus im August 2009 vom UKD im 3. Trimenon einer Schwangerschaft übernommen wurde. Es wurde eine Not-Section durchgeführt; intraoperativ fanden sich sichtbare Raumforderungen im Bauchraum, die ebenso wie die Adnexe reseziert wurden. Außerdem wurden im aktuellen Verlauf ein tumoröser Befall der linken Pleurahöhle, des Mediastinums, des Perikards, beider Mammæ, des Magens, des Dünndarms, beider Nebennieren, der linken Niere, des Pankreas und des Peritoneums festgestellt, und zwar durch ein Burkitt-Lymphom.

Die Patientin wurde in der Statistik als positiv in der Gruppe der Lymphome / Leukämien geführt. Ihre Liquorzytologie war negativ. Hieraus folgt eine Zuordnung als falsch negativer Fall. Der klinische Verlauf erwies sich als günstig. Nach Chemotherapie kam die Patientin in Vollremission und zeigte bis zum letzten Kontakt mit dem UKD im Januar 2013 keinen Hinweis auf ein Rezidiv.

Ein Lymphombefall des ZNS und der Liquorräume blieb letzten Endes unbewiesen. Die Entscheidung zur Zuordnung in die Lymphom-/Leukämiegruppe folgte der Tatsache des ungewöhnlich fortgeschrittenen Befalls von Organen und auch seröser Körperhöhlen.

Patientin 29: Morbus Hodgkin unter Chemotherapie

Eine 29-jährige Patientin mit einem seit drei Monaten bekannten Morbus Hodgkin vom klassischen Subtyp im Stadium IIIB und seit 10 Wochen laufender Chemotherapie mit zum Zeitpunkt der Liquorpunktion klinisch-bildgebender Komplettremission.

Aufgrund der Komplettremission wurde die Patientin in der negativen Gruppe geführt, also ein Liquorraumbefall nicht angenommen. Ihre Liquorzytologie war negativ, was somit formal einem richtig negativen Befund entspricht.

Auch hier bleibt aber letztendlich unbewiesen, dass im Liquorraum zum Zeitpunkt der Liquorentnahme keine Tumorzellen (mehr) vorhanden waren; man kann nur belegen, dass keine aspiriert wurden.

Patient 41: Metachron multipel metastasiertes malignes Melanom

Ein 65-jähriger Patient mit einem seit gut fünf Jahren bekannten malignen Melanom mit operierten Metastasen in Lunge und Nebennieren sowie einer vor drei Jahren operativ entfernten linksfrontalen Metastase im Großhirn. Zuletzt vor einem Jahr eine Lymphknotenmetastase in der linken Leiste. Seit 3 Monaten verstärktes Auftreten einer jahrelang vorbekannten Migräne mit mehrmaligem Erbrechen und Nicht-Ansprechen auf Analgetika. In MRT und CT aktuell keine Auffälligkeiten.

Der Patient wurde aufgrund seiner aktuellen Klinik und der Metastasierungsfreudigkeit seines Primärtumors in der Gruppe der positiven Fälle geführt. Die Liquorzytologie im Dezember 2009 war unauffällig, sodass ihr Resultat als falsch negativ eingeordnet wurde.

Inwieweit wirklich eine erneute Metastase im Gehirn bzw. im Liquorraum vorgelegen hat, bleibt offen, da keine weiteren Angaben aus der Zeit nach der Liquorpunktion vorliegen. Die neurologische Symptomatik lässt aber nach wie vor daran denken.

Patient 108: Fulminanter Verlauf einer akuten myeloischen Leukämie (AML)

Ein 68-jähriger Patient mit vor fünf Monaten erfolgter Erstdiagnose eines myelodysplastischen Syndroms vom Typ RAEB II mit Übergang in eine sekundäre AML; klinisch mediastinale und links axilläre Lymphadenopathie, Antrumgastritis, Ulcus ventriculi, intermittierende *Tachyarrhythmia absoluta*, eingeschränkte kardiale Pumpfunktion mit deutlichen peripheren Ödemen, geringe Pleuraergüsse und Perikarderguss sowie aktuell Urosepsis.

Die Liquorpunktion erfolgte aufgrund eines generalisierten Krampfanfalls, das craniale CT war unauffällig bis auf eine kleine Verdickung der *Falx cerebri*. Laborchemisch im Liquor erhöhte Leukozytenzahl, zytologisch geringe Pleozytose

durch überwiegend lytische Zellen, wie nach abgelaufener Entzündung, somit negativer Liquorbefund. Laut Arztbrief wurde „im Hinblick auf die manifeste *Meningeosis leucaemica* und die infauste Prognose nach Rücksprache mit den Angehörigen von einer weiteren Therapie abgesehen“; der Patient starb wenige Tage nach der Liquorpunktion.

Klinisch wurde somit trotz der nur geringen CT-Veränderungen aufgrund des gravierenden aktuellen neurologischen Ereignisses ein leukämischer Befall des Liquorraumes angenommen, sodass unter dieser formal aber unbewiesenen Annahme der zytologische Liquorbefund falsch negativ wäre.

Schaut man sich den Patientenpool an, der in dieser Studie untersucht wurde, fällt allgemein auf, dass viele Liquorpunktionen bei bereits gesicherten und unter Therapie stehenden Erkrankungen zur Stadienbestimmung vorgenommen werden, also „anbehandelt“ sind. Von den 87 negativ beurteilten Tumorfällen befanden sich 66 Patienten unter laufender Therapie oder hatten diese bereits abgeschlossen, was in dieser Patientengruppe einen Anteil von 75,9 % ausmacht.

In Studien anderer Arbeitsgruppen wird auf das Thema der diagnostischen Entscheidungskriterien zu einer Meningeose wenig eingegangen. Die Problematik der vorliegenden Studien besteht zum einen in den unvollständigen Angaben über Zeitraum, Materialgewinnung, Präparatherstellung oder morphologische Analysen, zum anderen in den deutlich unterschiedlichen Interpretationsweisen zytologischer Bilder. Die Schwierigkeit aller angegebenen Studien ist es, einen einheitlichen und vertretbaren Referenzstandard einzuführen. Dieses Bild zeigt sich generell, wenn man Studien zur Treffsicherheit der Liquorzytologie untersucht. In manchen Arbeiten wie bei Baehring et al. (2006) werden ähnlich wie in der vorliegenden Studie unter anderem klinische Diagnosen, Bildgebung und Histologie dem zytologischen Ergebnis gegenübergestellt, während in anderen, wie beispielsweise bei Subirá et al. (2015), der Befund aus der Wiederholungspunktion als Referenz genommen wird. In wiederum anderen Arbeiten wird gänzlich darauf verzichtet, auf Tumorzell-negative Diagnosen einzugehen, sodass sich Aussagen, bezogen auch auf große Kollektive, darauf beschränken, die Verteilung der Primärtumoren bei den Tumorzell-positiven Fällen anzugeben und darauf zu

verweisen, dass keine falsch-positiven Diagnosen aufgetreten seien (An-Foraker 1985, Hyun et al., 2016).

Aus diesen beispielhaft aufgeführten Studien erkennt man die Schwierigkeit der Erstellung einer aussagekräftigen Treffsicherheit der Liquorzytologie. Hinzu kommt, wie bereits in der Arbeit von Canovi und Campioli (2016) diskutiert, eine unterschiedliche Herangehensweisen zur Kategorisierung atypischer oder verdächtiger Zellen, was in der Auswertung zu deutlichen Diskrepanzen in den Ergebnissen führt. So können Fälle mit "verdächtigen" Zellen in die negativen Befunde eingeordnet werden, andererseits aber auch als positiv bewertet werden. Dahinter können verschiedene Konzepte stecken, die jeweils nicht falsch oder illegitim sein müssen. Soll mit dem Untersuchungsergebnis ein Anfangsverdacht dargestellt werden, dann könnte das Hinzunehmen von zweifelhaften Befunden zur positiven Gruppe Sinn machen. Geht es hingegen darum, eingreifende therapeutische Entscheidungen wie z.B. über eine aggressive Chemotherapie zu treffen, dann dürften zweifelhafte Diagnosen eher in die negative Gruppe eingeordnet werden, da sie nicht genügen dürften, um therapeutisch tätig zu werden.

Geht man einmal davon aus, dass die klinischen Ärzte und die Pathologen Absprachen treffen können, mit denen sich ein *sampling error* in den meisten Fällen vermeiden lassen wird, und dass die Pathologen Tumorzellen im Liquor genauso gut finden können wie in anderen Probenarten, sodass auch der *screening error* überschaubar ist, dann bleiben die Schwierigkeiten in der Zuordnung der Patienten als positiv oder negativ als Hauptquelle für nicht überzeugende Werte bei der Berechnung der Sensitivität übrig. Es ist also offenbar der *clinical error*, der Statistiken in der Liquorzytologie erschwert.

4.6 Adjuvante Methoden in der liquorzytologischen Tumor-diagnostik

In den vergangenen 25 Jahren sind eine Reihe adjuvanter Verfahren in der Zytologie etabliert worden (Übersicht: Biesterfeld et al. 2013) und stehen somit auch der Liquorzytologie prinzipiell zur Verfügung. Zu ihnen gehören konventionelle Sonderfärbungen wie die PAS-Färbung oder die Eisenfärbung, außerdem die Immunzytochemie, die DNA-Bildzytometrie und die Durchflusszytometrie, seit einiger Zeit auch molekulare

Untersuchungsverfahren. Gleich ist diesen Methoden, dass keine von ihnen einen 100%-igen „Tumormarker“ repräsentiert, anhand dessen man Malignität beweisend annehmen kann. Vielmehr ist es so, dass die mit ihnen erhaltenen Befunde eine Tumorannahme entkräften oder untermauern können und dass die Interpretation im Kontext der Morphologie erfolgen muss.

Konventionelle Sonderfärbungen werden an Liquorproben kaum vorgenommen, vielleicht abgesehen von einer Eisenfärbung, mit der man pigmentierte Makrophagen (nach älterer Einblutung) von Melanomzellen abgrenzen könnte. Gleiches gilt für die DNA-Bildzytometrie, bei der man ca. 300 Zellen der auffälligen Zellpopulation auswerten können muss, was beim Liquor kaum gelingen wird.

Eine wichtige Rolle hingegen kommt der Immunzytochemie zu. Wie oben an der Arbeit von Bae et al. (2013) bereits dargestellt, ist es beispielsweise möglich, Liquorpräparate auch mit einem Pan-Zytokeratin-Antikörper zu inkubieren und dessen Bindungsstellen in eine Farbreaktion umzusetzen. Auf diese Weise ist es möglich, morphologisch auffällige Zellen als Zytokeratin-negativ bzw. als Zytokeratin-positiv zu kategorisieren. Während Zellen ohne Zytokeratin-Expression nicht auf Karzinomzellen verdächtig sind, dürften die meisten Zytokeratin-positiven Zellen zu einem Karzinom gehören. Dass aus dem Ausfall einer Zytokeratin-Immunzytochemie allein keine Diagnose gelingt, hat mit zwei Aspekten zu tun. Zum einen gibt es auch Zytokeratin-negative Tumorzellen, insbesondere bei Lymphomen oder Leukämien, zum anderen kommen Zytokeratin-positive Zellen vor, die nicht aus einem Tumor stammen, nämlich aus dem Ependym oder den Meningen.

Boogerd et al. (1988) haben eine Studie anhand von 118 Proben erstellt, welche von 20 Patienten stammen, die bereits eine klinisch nachgewiesene maligne Erkrankung hatten. Sie untersuchten die Treffsicherheit der reinen Zytologie und verglichen diese mit einer Immunzytologischen Untersuchung. Das Besondere in dieser Studie war, dass in den 103 der Fälle ventrikulärer Liquor aus Ommaya-Reservoirs zur Untersuchung gelangte. Nach Auswertung der Daten kamen sie zu dem Schluss, dass die Kombination der reinen Zytologie mit der Immunzytologie einen Zuwachs an diagnostischer Information

brachte. Ohne Immunzytologie waren 83 der 118 Proben positiv (70,3%), nach Durchführung waren es 90 (76,3%).

Besteht ein Lymphomverdacht, so kann die Immunzytochemie ebenfalls zu einer Klärung der Frage nach einem Liquorinfiltrat beitragen. Hierzu kann man zunächst Antikörper gegen CD3 (positiv in T-Zellen) und CD20 bzw. CD79a (positiv in B-Zellen) einsetzen. Die reaktiven lymphatischen Zellen in Liquorproben sind der T-Zell-Reihe zuzurechnen, sodass dann ein Überwiegen von CD3-positiven lymphatischen Zellen zu erwarten wäre. Die meisten Non-Hodgkin-Lymphome, ca. 85%, sind hingegen B-Zell-Lymphome. Entsprechend wäre ein Überwiegen von CD20-positiven lymphatischen Zellen als zumindest suspekt zu interpretieren. Die Abgrenzung zwischen lymphatischen Zellen und Monozyten kann mit CD163, das in Monozyten positiv sein müsste, erreicht werden.

Der Immunzytochemie sind am Liquor aber aufgrund der Präparation Grenzen gesetzt. Zum einen ist die Zahl der Präparate aufgrund der geringen Materialmenge von vornherein nicht hoch, zum anderen ist eine immunzytochemische Untersuchung an MGG-vorgefärbten Präparaten bislang international nicht etabliert. Warum dieses so ist, wurde bisher nicht systematisch geklärt, ist aber in der Cytopathologie am UKD Gegenstand einer aktuellen Studie.

Die komplementär zur Liquorzytologie anwendbare Durchflusszytometrie ist ein in der Pathologie weniger gebräuchliches Verfahren, das häufiger in der Inneren Medizin oder in klinisch-chemischen Laboren angewandt wird. Dabei werden Zellsuspensionen mit einem oder mehreren Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht. Gleichzeitig können pro Zelle simultan mehrere Eigenschaften bestimmt und quantifiziert werden. Aus dem Muster der Eigenschaften werden Rückschlüsse auf in der Suspension vorhandene bzw. nicht vorhandene Zellpopulationen gezogen.

Zur Detektion einer Meningeosis carcinomatosa wird die Verwendung einer EpCam-Markierung der Zellen im Liquor empfohlen. EpCam, auch bekannt unter den Namen berEP4, ESA, HEA-125 oder MOC-31, ist ein Antikörper, mit dem sich annähernd ausschließlich epitheliale Zellen darstellen. Er wird sowohl in der Zytologie und

Histologie, als auch in der Durchflusszytometrie angewandt. Auch bei der Durchflusszytometrie ist zu beachten, dass geringe Liquormengen, die Neigung zur schnellen Zelldegeneration, Blutbeimengungen etc. als technische Probleme bei der Beurteilung auftreten können; als notwendige Mindestmengen werden 5 ml Liquor bzw. 100 Tumorzellen aufgefasst (Milojkovic Kerklaan et al., 2016; Pillai und Dorfman, 2016, Subirá et al., 2015).

Bezogen auf Leukämien und Lymphome reicht es erneut, auf die Ergebnisse aus dem aktuellen Review von Canovi und Campioli (2016) zu verweisen. Hierzu wurden die in einer umfangreichen Tabelle dargestellten Daten der analysierten 27 Studien aufaddiert. Während zytologisch von 3248 nur 244 positiv waren, wurden durchflusszytometrisch 556 als positiv interpretiert (7,5% vs. 17,1%), also mehr als doppelt so viele, sodass man annehmen kann, dass die Durchflusszytometrie auf diesem Gebiet aussagekräftiger ist. Allerdings scheinen sich beide Methoden auch ergänzen zu können. Schaut man nämlich im Detail hin, so waren 222 Proben sowohl in der Zytologie, als auch in der Durchflusszytometrie positiv (6,8% von 3248), 22 nur in der Zytologie (0,7%) und 334 nur in der Durchflusszytometrie (10,3%). Es bleiben somit zumindest einige Proben über, die sich als Lymphom- oder Leukämieinfiltrat rein zytologisch erschließen. Welche Antikörper in den (wie oben bereits erwähnt) sehr heterogenen Studien eingesetzt wurden, ist dem Review detailliert zu entnehmen, soll aber hier nicht referiert werden.

4.7 Liquordiagnostik nicht-neoplastischer Erkrankungen

Die Liquordiagnostik bei nicht-neoplastischen Erkrankungen wird seitens der Neurologen als wichtiger Bestandteil der Diagnosestellung gesehen. Hierbei steht die Liquorzytologie weniger im Vordergrund, vielmehr kommen andere Kompetenzen zum Tragen. In den bereits erwähnten „Leitlinien und Methodenkatalog der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie“ (Petereit et al., 2007) werden explizit in alphabetischer Reihenfolge Empfehlungen zu folgenden nicht-neoplastischen Erkrankungen gegeben: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, Demenz, Enzephalitis, Fazialisparese, peripheres Guillain-Barré-Syndrom, Meningitis, multiple Sklerose, Myelitis, Neuro-AIDS und opportunistische Infektionen, Neuroborreliose, Neurolues, neuropsychiatrischer Lupus erythematosus, Neurotuberkulose, Neurosarkoidose, Radikulitis, Subarachnoidalblutung (SAB) und Ventrikulitis.

Ohne auf die diagnostischen Kriterien der einzelnen Erkrankungen in der Liquordiagnostik genauer einzugehen, kann man allgemein sagen, dass die Methoden der Serologie, Mikrobiologie, Virologie und Molekularbiologie ineinander greifend angewandt werden und Entscheidungsbäume entwickelt wurden, anhand derer man zu Differentialdiagnosen bzw. einer abschließenden Diagnose gelangen kann. Eine tabellarische Darstellung aus den „Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis“ einer *Task Force*-Gruppe der *European Federation of Neurological Sciences* (EFNS), in der Laborparameter einer Art Basislabor und zytologische Aspekte berücksichtigt werden, ist unten wiedergegeben (Abb. 18) (Deisenhammer et al., 2006).

	Total protein (g/l)	Glucose ratio (mmol/l)	Lactate	Cell count	Typical cytology (per 3.2 µl)
Normal values ^a	<0.45	>0.4-0.5	<1.0-2.9	<15	MNC
Disease					
Acute bacterial meningitis	↑	↓	↑	>1000	PNC
Viral neuro-infections (meningo/encephalitis)	=/↑	=/↓	=	10-1000	PNC/MNC
Autoimmune polyneuropathy	↑	=	=	=	
Infectious polyneuropathy	↑	=	=	↑	MNC
Subarachnoidal haemorrhage	↑	=	=	↑	Erythrocytes, macrophages, siderophages, MNC
Multiple sclerosis	=	=	=	=/↑	MNC

CSF, cerebrospinal fluid; MNC, mononuclear cells; PNC, polymorphonuclear cells. ↑/↓, increased/decreased; =, within normal limits; na, evidence not available. ^aNormal values are given for lumbar CSF in adults.

Abb. 18: Typische Liquorbefundkonstellationen ausgewählter nicht-neoplastischer neurologischer Erkrankungen (gekürzt und entsprechend modifiziert nach Deisenhammer et al., 2006). *MNC* = Lymphozyten und Monozyten. *PNC* = Granulozyten. *Glucose ratio* = Quotient aus Glukosegehalt im Liquor und Glukosegehalt im Serum; eigentlich ohne Einheit, in der Abbildung fälschlich mit der Einheit mmol/l versehen

Die Abbildung zeigt exemplarisch, wie man bereits aus den Werten für Gesamtprotein, Glukosequotient, Laktatwert, Zellzahl und Liquorzytologie gewisse Schlüsse in Richtung bestimmter nicht-neoplastischer Erkrankungen ziehen kann. Diese müssten dann ggfls. um weitere Laborergebnisse sowie um Untersuchungsergebnisse aus Serologie und Molekularbiologie, z.B. zum Erregernachweis, ergänzt werden, die in der genannten Arbeit spezifiziert werden, hier aber nicht näher erläutert werden sollen. Der Liquor-

zytologie kommt im Kontext nicht-neoplastischer Differentialdiagnosen anders als bei neoplastischen Erkrankungen eine geringere Bedeutung zu. Sie bezieht sich im Wesentlichen auf die Feststellung, ob eine Prädominanz von Granulozyten (in Abb. 18: PNC) oder von Monozyten bzw. Lymphozyten (in Abb. 18: MNC) besteht.

In unserem Krankengut kamen zusammenfassend nur ein einziger Fall mit deutlicher Granulozytose vor, und zwar unter dem Bild einer fibrinös-eitrigen Entzündung im Liquorraum bei klinischem Verdacht auf einen Abszess. Vermutlich werden im Untersuchungszeitraum aufgetretene klinische Diagnosen von akuter Meningitis, bei denen ja üblicherweise eine eindeutige Klinik besteht, vorwiegend unter Berücksichtigung serologischer und mikrobiologischer Methoden gelöst worden sein.

Vermehrungen von Lymphozyten und Monozyten, ausgedrückt je nach Zusammensetzung und Ausmaß als lymphozytäre, lymphomonozytäre oder monozytäre Pleozytose leichten, mäßigen oder deutlich ausgeprägten Grades, wurden hingegen in 78 Fällen diagnostiziert, kamen also durchaus häufig vor. Das Auftreten einer Pleozytose war dabei erwartungsgemäß nur wenig spezifisch und wurde sowohl bei klinisch als entzündlich eingeordneten Fällen, als auch bei Tumorzell-negativen Proben von Tumorpatienten beobachtet. Vermutlich stellt das Einwandern von Lymphozyten und Monozyten in den Liquorraum eine allgemeine Reaktion auf chronisch-entzündliche Reize dar.

4.8 Ausblick

Das jeweilige Methodenspektrum in der klinischen und morphologischen Diagnostik ist in den vergangenen Jahrzehnten dermaßen breit geworden, dass jedes Fach nur noch einen kleinen, aber wichtigen Aspekt eines klinischen Falles bearbeiten kann und insbesondere dem Diagnostiker nicht der Blick auf das Ganze offensteht. Dieses gilt auch für die Liquordiagnostik. Gerade wenn man sich einen akut neurologisch erkrankten Patienten vorstellt, dürften klinische Untersuchung, Bildgebung und Liquorpunktion üblicherweise in einem eher engen Zeitfenster ablaufen, sodass selbst bei bestem Bemühen der neurologischen Fachdisziplinen den diagnostischen Fächern nur unvollständige Informationen zur Verfügung stehen. Daher kommt insbesondere dem

Kliniker die Aufgabe zu, Ergebnisse von Untersuchungen beispielsweise durch ein klinisch-chemisches Labor, eine Mikrobiologie und eine Pathologie mit denen von Klinik und Bildgebung zusammenzuführen. Was die hier vorgelegte Arbeit in diesem Zusammenhang unterstreicht, ist, dass sich die Kliniker auf positive zytologische Tumordiagnosen verlassen können und auch wohl eine akute Meningitis ausgeschlossen ist, wenn sich kein granulozytär betontes Entzündungsinfiltrat findet. Was die Zytopathologie offenbar nicht allgemein leisten kann, sind die Identifikation aller Fälle von Meningeosis carcinomatosa und eine stringente Hilfestellung für die klinischen Kollegen in der Zuordnung chronisch-entzündlicher Zellbilder zu bestimmten Grunderkrankungen.

Aufgrund der oft begrenzten Zellzahl sind im Liquor der Weiterentwicklung morphologischer Aspekte Grenzen gesetzt. Inwieweit die Molekularpathologie hier als komplementäre Methode einen Platz erhalten wird, dürfte sich innerhalb der nächsten Jahre zeigen. Nach wie vor entwickelt sich dieses Feld der Pathologie schnell weiter, und die Möglichkeiten, die sich durch das NGS (*next generation sequencing*) ergeben, sind derzeit noch nicht absehbar. Bezogen auf den Liquor zeigen die wenigen verfügbaren Publikationen eher einen Schwerpunkt auf der Detektion mikrobieller Erreger.

Zu vermuten wäre außerdem, dass die meisten molekularen Anwendungen, die an einer sogenannten *Liquid biopsy* am Blutplasma entwickelt werden, auch an Liquorproben angewandt werden können. Erste Publikationen auf diesem Feld liegen für den Liquor bereits vor: Mit Stand vom 30.11.2017 werden in der Datenbank Pubmed neun Publikationen ausgewiesen, wenn man die beiden Begriffe "CSF" (für Liquor cerebrospinalis) und "liquid biopsy" kreuzt. Sie beziehen sich im Wesentlichen auf Tumorpathologie. Darunter befinden sich neben Arbeiten über hirneigene Tumoren auch solche zu einem metastasierten Mammakarzinom (Siravegna et al., 2017) oder zu Bronchialkarzinomen (Offin et al., 2017). Dieses könnte beispielsweise bedeuten, dass bestimmte genetische Muster, die in einem Primärtumor gefunden worden waren, in einer solchen Liquorprobe gesucht würden und für den Fall, dass sie dort identifiziert würden, auch zur Diagnose einer Meningeosis carcinomatosa mit allen therapeutischen Konsequenzen führen könnten, selbst wenn keine Tumorzellen morphologisch nachgewiesen würden. Allgemein wird diese Methode derzeit noch nicht als klinische Routine betrachtet (Dahl

und Kloten, 2015), aber auf wissenschaftlichen Tagungen breit diskutiert und zunehmend als zukunftsweisend betrachtet. Vor einer Überführung in die Routine wären allerdings vergleichende Studien notwendig, in denen insbesondere die Quote falsch positiver molekularer Diagnosen bestimmt werden müsste.

5 Literaturverzeichnis

1. An-Foraker, S. H. (1985). Cytodiagnosis of malignant lesions in cerebrospinal fluid. Review and cytohistologic correlation. *Acta Cytol*, 29(3), 286-290.
2. Assi, R., Hamieh, L., Mukherji, D., Haydar, A., Temraz, S., El-Dika, I., Shamseddine, A. (2015). Leptomeningeal metastasis as initial manifestation of signet ring colorectal adenocarcinoma: a case report with review of literature. *J Gastrointest Oncol*, 6(6), E89-E101.
3. Bae, Y. S., Cheong, J. W., Chang, W. S., Kim, S., Oh, E. J., Kim, S. H. (2013). Diagnostic Accuracy of Cerebrospinal Fluid (CSF) Cytology in Metastatic Tumors: An Analysis of Consecutive CSF Samples. *Korean J Pathol*, 47(6), 563-568.
4. Baehring, J. M., Hochberg, F. H., Betensky, R. A., Longtine, J., Sklar, J. (2006): Immunoglobulin gene rearrangement analysis in cerebrospinal fluid of patients with lymphoproliferative processes. *J Neurol Sci* 247(2): 208-216.
5. Balm, M., Hammack, J. (1996). Leptomeningeal carcinomatosis. Presenting features and prognostic factors. *Arch Neurol*, 53(7), 626-632.
6. Biesterfeld S (2015): Zurverfügung urheberrechtlich geschützter Abbildungen aus dem Bestand des Schwerpunktes Cytopathologie der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf bzw. des Pathologischen Institutes Koblenz
7. Biesterfeld S., Pomjanski N., Schramm M. (2013). Adjuvante Methoden in der diagnostischen Zytopathologie. *Verh Dtsch Ges Zyt*, 28, 8-16.
8. Bigner, S. H., Johnston, W. W. (1983). *Cytopathology of the central nervous system*. New York: Masson.
9. Böcking, A. (1998). Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie. *Pathologe*(19), 235-258.
10. Bölefahr, M. A. (2011). Diagnostische Treffsicherheit der Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) mit adjuvanter DNA-Zytometrie bei malignomverdächtigen pankreatischen Raumforderungen. *Med. Diss., Heinrich Heine Universität Düsseldorf*
11. Bommer, M., Nagy, A., Schopflin, C., Pauls, S., Ringhoffer, M., Schmid, M. (2011). Cerebrospinal fluid pleocytosis: pitfalls and benefits of combined analysis using cytomorphology and flow cytometry. *Cancer Cytopathol*, 119(1), 20-26
12. Boogerd, W., Vroom, T. M., van Heerde, P., Brutel de la Riviere, G., Peterse, J. L., van der Sande, J. J. (1988). CSF cytology versus immunocytochemistry in meningeal carcinomatosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 51(1), 142-145.
13. Born, I. (2016). Verbesserung der Treffsicherheit der zytologischen Lungenkarzinomdiagnostik mittels adjuvanter Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und DNA-Bildzytometrie. *Med. Diss., Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*

14. Bossuyt, P. M., Reitsma, J. B., Bruns, D. E., Gatsonis, C. A., Glasziou, P. P., Irwig, L. M., Moher D., Rennie D., de Vet H. C., Lijmer J. G., Standards for Reporting of Diagnostic, A. (2003). The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. *Ann Intern Med*, 138 (1), W1-W12.
15. Brinker, T., Stopa, E., Morrison, J., Klinge, P. (2014). A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids Barriers CNS*, 11, 10
16. Bubendorf, L., Feichter, G. E., Obermann, E. C., Dalquen, P (2011): Zytopathologie. In: Klöppel, G., Kreipe, H. H., Remmele, W. (Hrsg.): Pathologie. Springer Verlag, Berlin, 3. Auflage, Band 8.
17. Canovi, S., Campioli, D. (2016). Accuracy of flow cytometry and cytomorphology for the diagnosis of meningeal involvement in lymphoid neoplasms: A systematic review. *Diagn Cytopathol*, 44(10), 841-856.
18. Ceelen, G. H. (1964). The cytologic diagnosis of ascitic fluid. *Acta Cytol*, 8(3), 175-185.
19. Chamberlain M. C. (1997): Carcinomatous meningitis. *Arch Neurol* 54: 16-17
20. Chamberlain, M. C. (2005). Neoplastic meningitis. *J Clin Oncol*, 23(15), 3605-3613.
21. Dahl E, Kloten V (2015). Liquid-biopsy-Analysen mithilfe zellfreier DNA (cfDNA). Möglichkeiten und Grenzen. *Pathologe* 36 (6): 572-578.
22. Dahlmann N, Zettl UK, Kumbier E (2017): The Development of Sayk's Cell Sedimentation Chamber: A Historical View on Clinical Cerebrospinal Fluid Diagnostics. *Eur Neurol* 77 (3-4): 162-167
23. Dannenberg, K. (2014). Diagnostische Treffsicherheit der Perikardergusszytologie. Med. Diss., Heinrich Heine Universität Düsseldorf
24. Deisenhammer, F., Bartos, A., Egg, R., Gilhus, N. E., Giovannoni, G., Rauer, S., Sellebjerg F., EFNS Task Force (2006). Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. *Eur J Neurol*, 13(9), 913-922.
25. Diener, H. C.; Weimar, C. (2012). Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Herausgegeben von der Kommission "Leitlinien" der DGN. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 5. Auflage
26. Ducos, R., Donoso, J., Weickhardt, U., Vietti, T. J (1979). Sedimentation versus cytocentrifugation in the cytologic study of craniospinal fluid. *Cancer* 43(4): 1479-1482.
27. Feichter, G. E., Dalquen, P. (2000): Zytopathologie. Springer Verlag, Berlin
28. Fink, C. (2015). Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik an Pleuraergüssen unter Berücksichtigung adjuvanter Methoden. Med. Diss., Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

29. Freilich, R. J., Krol, G., de Angelis, L. M. (1995). Neuroimaging and cerebrospinal fluid cytology in the diagnosis of leptomeningeal metastasis. *Ann Neurol*, 38(1), 51-57
30. Gill, S. K., Padmanabhan, V., Hickey, W. F., Marotti, J. D. (2015). Glioblastoma multiforme with epithelial differentiation: a potential diagnostic pitfall in cerebrospinal fluid cytology. *Diagn Cytopathol*, 43(8), 638-641.
31. Glantz, M. J., Cole, B. F., Glantz, L. K., Cobb, J., Mills, P., Lekos, A., Walters, B. C., Recht, L. D. (1998). Cerebrospinal fluid cytology in patients with cancer: minimizing false-negative results. *Cancer*, 82(4), 733-739.
32. Glass, J. P., Melamed, M., Chernik, N. L., Posner, J. B. (1979). Malignant cells in cerebrospinal fluid (CSF): the meaning of a positive CSF cytology. *Neurology*, 29(10), 1369-1375.
33. Gondos, B., King, E. B. (1976). Cerebrospinal fluid cytology: diagnostic accuracy and comparison of different techniques. *Acta Cytol*, 20(6), 542-547.
34. Grant, R., Condon, B., Hart, I., Teasdale, G. M. (1991). Changes in intracranial CSF volume after lumbar puncture and their relationship to post-LP headache. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 54(5), 440-442.
35. Haastert, K. (2014). Einsatz adjuvanter Methoden in der Perikardergusszytologie. Med. Diss., Heinrich Heine Universität Düsseldorf.
36. Hansen, H. H. (1969). The cytocentrifuge and cerebrospinal fluid cytology. *Acta Cytol*, 13, 541-551.
37. Hilgers, R. D., Bauer, P., Scheiber, V. (2007). Einführung in die Medizinische Statistik. Springer Verlag, Berlin / Heidelberg, 2. Auflage
38. Hyun, J. W., Jeong, I. H., Joung, A., Cho, H. J., Kim, S. H., Kim, H. J. (2016). Leptomeningeal metastasis: Clinical experience of 519 cases. *Eur J Cancer*, 56, 107-114.
39. Kaplan, J. G., DeSouza, T. G., Farkash, A., Shafran, B., Pack, D., Rehman, F., Fuks, J., Portenoy, R. (1990). Leptomeningeal metastases: comparison of clinical features and laboratory data of solid tumors, lymphomas and leukemias. *J Neurooncol*, 9(3), 225-229.
40. Kluge, H., Wiczorek, V., Linke, E., Zimmermann, K., Witte, O. W. (2005). Atlas der praktischen Liquorzytologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
41. Kölmel, H. W. (1978). Liquorzytologie. Springer Verlag, Berlin / Heidelberg
42. Kölmel, H. W. (1998). Cytology of neoplastic meningitis. *J Neurooncol*, 38(2-3), 121-125.
43. Koss, L. G., Melamed, M. R. (2006) (Hrsg.): Diagnostic cytology and its histopathologic bases. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia

44. Kuntz, K. M., Kokmen, E., Stevens, J. C., Miller, P., Offord, K. P., Ho, M. M. (1992). Post-lumbar puncture headaches: experience in 501 consecutive procedures. *Neurology*, 42(10), 1884-1887.
45. Kuppuswamy, L. (2017). Treffsicherheit der Zytodiagnostik bei endosonographisch gewonnenen Nebennierenpunktaten. Med. Diss., Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
46. Lee, J. S., Melisko, M. E., Magbanua, M. J., Kablanian, A. T., Scott, J. H., Rugo, H. S., Park, J. W. (2015). Detection of cerebrospinal fluid tumor cells and its clinical relevance in leptomeningeal metastasis of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 154(2), 339-349.
47. Louis DN (2016). WHO classification and grading of tumors of the central nervous system. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (Hrsg.): WHO classification of tumours of the central nervous system. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, S. 12-13.
48. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* 131 (6): 803-820.
49. Matsumae, M., Sato, O., Hirayama, A., Hayashi, N., Takizawa, K., Atsumi, H., Sorimachi, T. (2016). Research into the Physiology of Cerebrospinal Fluid Reaches a New Horizon: Intimate Exchange between Cerebrospinal Fluid and Interstitial Fluid May Contribute to Maintenance of Homeostasis in the Central Nervous System. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 56(7), 416-441.
50. Milojkovic Kerklaan, B., Pluim, D., Bol, M., Hofland, I., Westerga, J., van Tinteren, H., , Beijnen, J. H., Boogerd, W., Schellens, J. .H, Brandsma, D. (2016). EpCAM-based flow cytometry in cerebrospinal fluid greatly improves diagnostic accuracy of leptomeningeal metastases from epithelial tumors. *Neuro Oncol*, 18(6), 855-862.
51. Motherby, H., Nadjari, B., Friegel, P., Kohaus, J., Ramp, U., Böcking, A. (1999). Diagnostic accuracy of effusion cytology. *Diagn Cytopathol*, 20(6), 350-357.
52. Oehmichen, M. (1976). Cerebrospinalfluid cytology. An introduction and atlas. Thieme-Verlag, Stuttgart
53. Offin M, Chabon JJ, Razavi P, Isbell JM, Rudin CM, Diehn M, Li BT (2017). Capturing genomic evolution of lung cancers through liquid biopsy for circulating tumor DNA. *J Oncol* 2017:4517834.
54. Oschmann, P., Brettschneider, J., Reiber, H., Ebinger, F., Wildemann, B. (2006). Neurologische Labordiagnostik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
55. Pairwuti, S. (1991): False-negative Papanicolaou smears from women with cancerous and precancerous lesions of the uterine cervix. *Acta Cytol* 35(1): 40-46

56. Pan, Z., Yang, G., Wang, Y., He, H., Pang, H., Gao Y., Shi W., Li Y, Dong L., Song, Y. (2015): Thinprep plus Papanicolaou stain method is more sensitive than cytospin-coupled Wright Giemsa stain method in cerebrospinal fluid cytology for diagnosis of leptomeningeal metastasis from solid tumors. PLoS ONE 10(4): e0122016.
57. Perske C, Nagel I, Nagel H, Strik H (2011): CSF cytology - the ongoing dilemma to distinguish neoplastic and inflammatory lymphocytes. Diagn Cytopathol 39 (8): 621-626
58. Petereit H.-F., Sindern, E., Wick, M. (Hrsg.) (2007). Liquordiagnostik: Leitlinien der Liquordiagnostik und Methodenkatalog der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie. Springer-Verlag, Berlin
59. Pfister, H.-W., et al. (2015)³: S2k-Leitlinie "Ambulant erworbene bakterielle (eitrige) Meningoenzephalitis im Erwachsenenalter" Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.): Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 30.11.2017)
60. Pillai, V., Dorfman, D. M. (2016). Flow Cytometry of Nonhematopoietic Neoplasms. Acta Cytol, 60(4), 336-343.
61. Potemkowski, A., Lehmitz, R., Nowacki, P. (1995). [Methods of cytological analysis of cerebrospinal fluid: development, problems, present state]. Neurol Neurochir Pol, 29(1), 59-67.
62. Ranta, S., Nilsson, F., Harila-Saari, A., Saft, L., Tani, E., Söderhäll, S., Porwit, A., Hultdin, M., Noren-Nyström, U., Heyman, M. (2015). Detection of central nervous system involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia by cytomorphology and flow cytometry of the cerebrospinal fluid. Pediatr Blood Cancer, 62(6), 951-956.
63. Ray, P., Badarou-Acosi, G., Viallon, A., Boutoille, D., Arthaud, M., Trystram, D., Riou, B. (2007). Accuracy of the cerebrospinal fluid results to differentiate bacterial from non bacterial meningitis, in case of negative gram-stained smear. Am J Emerg Med, 25(2), 179-184.
64. Rosenthal, D. (1984). Cytology of the central nervous system. Karger-Verlag, Basel
65. Sakka, L., Coll, G., Chazal, J. (2011). Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis, 128(6), 309-316.
66. Sayk, J. (1954). Ergebnisse neuer liquorcytologischer Untersuchungen mit dem Sedimentkammervorgang. Ärztl Wochenschr 9, 1042-1046.
67. Schwab, S., Schellinger, P., Werner, C., Unterberg, A., Hacke, W. (2015). Neuro-Intensiv. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

³ Die Zitierung erfolgt gemäß den in der PDF-Version der S2k-Leitlinie gemachten Vorgaben. Die unter "et al." subsummierten Mitautoren werden in ihr nicht namentlich genannt.

68. Seal, S. H. (1956). A method for concentrating cancer cells suspended in large quantities of fluid. *Cancer*, 9(5), 866-868.
69. Shin, S. Y., Lee, S. T., Kim, H. J., Oh, Y. L., Kim, S. J., Kim, W. S., Kim, S. H. (2016). Usefulness of Flow Cytometric Analysis for Detecting Leptomeningeal Diseases in Non-Hodgkin Lymphoma. *Ann Lab Med*, 36(3), 209-214.
70. Siravegna G, Geuna E, Mussolin B, Crisafulli G, Bartolini A, Galizia D, Casorzo L, Sarotto I, Scaltriti M, Sapino A, Bardelli A, Montemurro F (2017). Genotyping tumour DNA in cerebrospinal fluid and plasma of a HER2-positive breast cancer patient with brain metastases. *ESMO Open* 9: 2(4): e000253.
71. Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., Wittekind, C. (2010) (Hrsg.). TNM classification of malignant tumours. Wiley-Blackwell, Hoboken, 7. Ausgabe
72. Stojmenovic, G. M., Pavlovic, A. M., Gazibara, M. S., Grujicic, D., Radojicic, A., Sternic, N. C. (2016). Leptomeningeal carcinomatosis can be presenting manifestation of breast carcinoma. *Vojnosanit Pregl*, 73(3), 293-295.
73. Straathof, C. S., de Bruin, H. G., Dippel, D. W., Vecht, C. J. (1999). The diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging and cerebrospinal fluid cytology in leptomeningeal metastasis. *J Neurol*, 246(9), 810-814.
74. Subirá D, Simó M, Illán J, Serrano C, Castañón S, Gonzalo R, Granizo JJ, Martínez-García M, Navarro M, Pardo J, Bruna J (2015): Diagnostic and prognostic significance of flow cytometry immunophenotyping in patients with leptomeningeal carcinomatosis. *Clin Exp Metastasis* 32 (4): 383-391
75. Teunissen, C. E., Petzold, A., Bennett, J. L., Berven, F. S., Brundin, L., Comabella, M., Franciotta, D., Frederiksen, J. L., Fleming, J.O., Furlan, R., Hintzen, R.Q., Hughes, S.G., Johnson, M.H., Krasulova, E., Kuhle, J., Magnone, M. C., Rajda, C., Rejdak, K., Schmidt, H. K., van Pesch, V., Waubant, E., Wolf, C., Giovannoni, G., Hemmer, B., Tumani, H., Deisenhammer, F. (2009). A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology*, 73(22), 1914-1922.
76. Torzewski, M., Lackner, K.J., Bohl, J., Sommer, C. (2008). *Integrated Cytology of Cerebrospinal Fluid*. Springer Verlag, Berlin / Heidelberg
77. Viallon, A., Desseigne, N., Marjollet, O., Birynczyk, A., Belin, M., Guyomarch, S., Borg, J., Pozetto, B., Bertrand, J. C., Zeni, F. (2011). Meningitis in adult patients with a negative direct cerebrospinal fluid examination: value of cytochemical markers for differential diagnosis. *Crit Care*, 15(3), R136.
78. Wasserström, W. R., Glass, J. P., Posner, J. B. (1982). Diagnosis and treatment of leptomeningeal metastases from solid tumors: experience with 90 patients. *Cancer*, 49(4), 759-772.
79. Wiethölter, H., Oehmichen, M., Sayer, H. (1979). Qualitative CSF cell diagnosis. Methods and conclusiveness. *MMW Munich Med Wochenschr*, 121(18), 631-636.
80. Zettl, U. K., Lehmitz, R., Mix, E. (2005). *Klinische Liquordiagnostik*. Walter de Gruyter Verlag, Berlin, 2. Auflage.

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Stefan Biesterfeld für das Überlassen des interessanten Themas dieser Arbeit. Die sehr gute, freundliche und engagierte Zusammenarbeit, sowie seine stetige Verfügbarkeit und Bereitschaft zur Unterstützung haben in jeder Phase sehr zum Fortschritt und Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Außerdem geht mein herzlicher Dank für die zytologischen Befunde und den Zugang zu den klinischen Daten an Dr. Martin Schramm. Ferner möchte ich mich bei dem gesamten Team des Schwerpunktes Cytopathologie bedanken.