

Aus dem Institut für Pathologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Irene Esposito

**Immunzytochemische Marker in der Routinediagnostik:  
Status quo der Indikationsstellung der Immunzytochemie**

Dissertation

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

vorgelegt von

Sandra Jaschinski

2024

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

gez.:

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

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. S. Biesterfeld

Zweitgutachter/in: PD Dr. med. J. Felsberg

**Für meine Eltern**

**„Träume nicht dein Leben, sondern lebe deinen Traum“**

## I. Zusammenfassung deutsch

Die Immunzytochemie zeigt sich bereits seit nun mehreren Jahrzehnten in der zytologischen Routinediagnostik als adjuvante Untersuchungsmethode, an nur vereinzelten Standorten angewandt etabliert und stellt einen nicht mehr wegzudenkenden diagnostischen Teilbereich der Cytopathologie dar. Die konventionell-zytologische Mikroskopie gibt in Abhängigkeit von dem vorliegenden Zellbild die Richtung für eine sinnvolle und zielführende Auswahl der Antikörper bzw. Antikörperpanel vor. Stellt sich das Zellbild als „dringend verdächtig“ oder „zweifelhaft“ auf Tumorzellen dar, so unterscheidet sich die Wahl der Antikörper, im Vergleich zu dem Zellbild mit bereits „Tumorzell-positivem“ Befund. Für diese grundlegenden Fragestellungen haben sich als sehr nützlich erwiesene Markerpanel hinsichtlich einer Tumorzellidentifikation bzw. Tumorzelltypisierung bereits etabliert. Theoretische Entscheidungswege zur Indikation einer immunzytochemischen Untersuchung sind somit längst definiert, allerdings stellt sich die Frage, inwiefern diese Entscheidungswege eingehalten werden und wie viele Einzelfälle vorliegen, die sich den empfohlenen Entscheidungswegen entziehen und individuell beurteilt werden müssen.

Die vorliegende Studie hat das Ziel im Rahmen einer retrospektiv-explorativen Datenanalyse den „Status quo“ der Indikationsstellung und Indikationsdurchführung der Immunzytochemie zu eruieren. Hierbei wurde eine Kohorte von 376 Patientenfällen aus dem Jahr 2009, bestehend aus diversen Probenkategorien, dazugehörend Pleura- und Aszitespunktate sowie diverse andere untersucht.

Den ermittelten Ergebnissen zugrundeliegend lässt sich feststellen, dass die seinerzeit etablierten Antikörperpanel zur Tumorentifikation und Tumortypisierung nach wie vor aktuell sind und Tumorzellen sicher identifiziert bzw. typisiert werden können, wenngleich Einzelfälle existieren, die einen ergänzenden Einsatz von Antikörpern erforderlich machen. In unserer Studie konnten in 76 (84,4%) von 90 Fällen der Ergusspräparate Tumorzellen mit Hilfe des Markerpanels BerEP4, HEA125, Calretinin und CD68 hinsichtlich einer Tumorzellidentifikation gelöst werden. Zudem haben sich mit Hilfe des klassischen Markerpanels (CK5, CK7, CK20, cdx2, sowie TTF-1 und CA125) 90 (74%) von 122 zur Tumortypisierung untersuchten Fälle immunzytochemisch komplett lösen lassen.

Die Immunzytochemie stellt somit eine nach wie vor valide adjuvante Untersuchungsmethode dar, die auch in Zukunft, bei sich aktuell rasch entwickelnder Molekularpathologie mitentwickeln wird.

## II. Zusammenfassung englisch

Immunocytochemistry – used as a valuable adjuvant examination method at only a few sites/institutes – has been established in routine cytological diagnostics for several decades now and is still an indispensable diagnostic subfield of cytopathology. Depending on the cell image at hand, conventional cytological microscopy provides the direction for a sensible and targeted selection of antibodies or antibody panels. If the cell image is "strongly suspect" or "doubtful" on tumor cells, the choice of antibodies differs from the cell picture with already "tumor cell-positive" findings. For these fundamental questions, marker panels have already proven to be very useful with regard to tumor cell identification or tumor cell typing.

Theoretical decision-making pathways for the indication of an immunocytochemical examination have thus long been defined, but the question arises to what extent these decision-making paths are adhered to and how many individual cases exist that elude the recommended decision-making paths and must be assessed individually.

The main objective of the present study is to determine the "status quo" of the indication and indication implementation of immunocytochemistry within the framework of a retrospective-exploratory data analysis. A cohort of 376 patient cases, consisting of various sample categories, including pleural and ascites punctures, as well as various others from 2009, was examined.

Based on the results obtained, it can be stated that the antibody panels established at that time for tumor identification and tumor typing are still up-to-date and tumor cells can be reliably identified or typed, although there are individual cases that require additional use of antibodies. In our study, tumor cells could be identified in 76 (84.4%) of 90 cases of effusion preparations using the marker panel BerEP4, HEA125, Calretinin and CD68 for tumor cell identification. In addition, with the help of the classic marker panel (CK5, CK7, CK20, cdx2, as well as TTF-1 and CA125), 90 (74%) of 122 cases examined for tumor typing were completely resolved immunocytochemically.

Immunocytochemistry is therefore still a valid adjuvant examination method, which will continue to develop in the future, given the rapidly developing molecular pathology.

### III. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
AAT-1	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AEC-Reagenz	Entwicklungsreagenz für die Immunzytochemie
AFP	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
AgNOR	Versilberbare (Ag) <i>nuclear organizing regions</i>
AK	Antikörper
ALK	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
Anti-Myo-D1	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
AP	Aszitespunktat
B72.1	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
B72.3	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
BAL	broncho-alveoläre Lavage
bcl-2	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
BerEP4	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
BH	Bindehautabstrich
B-Zellen	eine bestimmte lymphatische Population
Ca.	Karzinom
CA125	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CD1a	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CD15	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CD20	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CD30	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CD34	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CD45RO	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CD56	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CD68	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie

CD79a	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CD99	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CD117	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CD138	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
Cd146	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CD168	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
cdx-2	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CEA	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CK	Zytokeratine, eine Gruppe von 20 Antikörpern für Immunhistochemie/-zytochemie (CK1 - CK20)
CK1/CK10/CK11	ein Antikörpermix für Immunhistochemie/-zytochemie
CK5/6	ein Antikörpermix für Immunhistochemie/-zytochemie
CK7	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CK8	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CK20	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
c-kit	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
CLL	chronisch-lymphatische Leukämie
COPD	Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
CPS	<i>Combined Proportion-Score</i> , ein Interpretationsmodus der PD-L1-Immunfärbung
CUP	<i>Cancer of unknown primary (site)</i>
D2-40	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
DAKO	Hersteller von Antikörpern und immunologischem Zubehör (Akronym aus Danmark und København)
dc-pathos	Bezeichnung der Datenbank der Cytopathologie
dc-systeme	Hersteller / Betreiber von dc-pathos
DD	Differentialdiagnose
DGP	Deutsche Gesellschaft für Pathologie
DGZ	Deutsche Gesellschaft für Zytologie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOG-1	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
DP	Douglaspunktat
EMA	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie

EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecules</i> , Namensgeber für eine Gruppe von Antikörpern für Immunhistochemie und Immunzytochemie)
ER	Östrogenrezeptor
EvG	Elastica nach van Gieson-Färbung, eine Sonderfärbung in Histologie und Zytologie
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FNP	Feinnadelpunktion
GATA-3	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
GFAP	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
Gl.	Glandula, lat. Wort für Drüse, beispielsweise Gl. parotis als Worte für die Ohrspeicheldrüse
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HEA-125	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung, eine Routinefärbung in Histologie und Zytologie
HepPar1	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
Her-2/neu	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
HMB-45	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
HNO	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
HPV	Humanes Papillom-Virus
IASLC	<i>International Association for Studies on Lung Cancer</i>
ICD-0	<i>International Classification of Diseases (Oncology)</i>
IC-Score	Immunologischer <i>Combined Score</i> , ein Interpretationsmodus der PD-L1-Immunfärbung
IgG	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
Ki-1	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
Ki-67	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
LCA	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
Leu-M1	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
LP	Liquorpunktat
LTx	Lebertransplantation
M	Morbus (bei Krankheiten mit Eigennamen, z.B. M. Hodgkin)

Melan A	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
MGG-Färbung	May-Grünwald-Giemsa-Färbung, eine Sonderfärbung in Histologie und Zytologie
MG-Lösung	May-Grünwald-Lösung
MIB-1	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
MIC2	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
Min.	Minuten
MKG	Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOC-31	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
MPNST	maligner peripherer Nervenscheidentumor
MS	Mundschleimhautabstrich
n	Zahl der Fälle
Napsin A	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
NH <sub>2</sub> OH	Hydroxylamin
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NS	Normalserum
NST	<i>no special type</i> , Begriff aus der Klassifikation der Mammakarzinome
NSE	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
NTx	Nierentransplantation
O13	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
Orange II2b	ein Farbstoff der Papanicolaou-Färbung
OT	Objektträger
p40	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
p504s / Racemase	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
p63	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
PAP-Färbung	Papanicolaou-Färbung, eine Routinefärbung in der Zytologie
PAS	Perjodsäure-Schiffreagenz-Färbung, eine Sonderfärbung in Histologie und Zytologie
PAS-D	Diastase-resistente Perjodsäure-Schiffreagenz-Färbung, eine Sonderfärbung in Histologie und Zytologie
PAX-8	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie

PBS	Phosphatpuffer ( <i>phosphate buffer solution</i> )
PD-L1	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
PE	Perikardpunktat
pH	<i>pondus hydrogenii</i> , Einheit des Säure-/Basegehaltes von Lösungen („pH-Wert“)
pM1a	bestimmtes Stadium der TNM-Klassifikation
PP	Pleurapunktat
PR	Progesteronrezeptor
PSA	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
PSMA	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
RCC	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
RF	Raumforderung
RH	Rundherd
ROS-1	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
S-100	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
Sec.	Sekunden
SO <sub>2</sub> -Wasser	Schwefeldioxid in wässriger Lösung
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
SurePath	ein Präparationsverfahren in der Dünnschichtzytologie
Tab.	Tabelle
ThinPrep	ein Präparationsverfahren in der Dünnschichtzytologie
TNM	Klassifikation für das Tumorstadium
TPS	<i>Tumor-Proportion-Score</i> , ein Interpretationsmodus der PD-L1-Immunfärbung
TRPS1	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
TTF-1	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
T-Zellen	eine bestimmte lymphatische Population
V.a.	Verdacht auf
vs.	gegen (= im Vergleich zu)
WT-1	ein Antikörper für Immunhistochemie/-zytochemie
x	Variable für die Vergrößerung eines Objektivs
z.B.	zum Beispiel

## IV. Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Immunzytochemie – Grundlagen</b>	<b>2</b>
1.1.1	Antigen-Antikörper-Reaktion / Immunreaktion	2
1.1.2.	Methoden der Immunzytochemie – direkte, indirekte Methode, ABC-Methode	3
1.1.3.	Besondere methodische Aspekte der Immunzytochemie	5
1.1.4.	Indikation und Stellung der Immunzytochemie im diagnostischen Ablauf	7
<b>1.2</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methodik</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>15</b>
2.1.1.	Datensatz - Inhalt und Bearbeitungsgrundlage	15
2.1.2	Patientenkollektiv	15
<b>2.2.</b>	<b>Methodik</b>	<b>16</b>
2.2.1	Grundlegende Arbeitsschritte der zytologischen Routinediagnostik	16
2.2.2	Zytologische Färbung nach Papanicolaou	17
2.2.3	May-Grünwald-Giemsa-Färbung (MGG)	18
2.2.4	PAS-Färbung	19
2.2.5	Verarbeitung von nativen Körperhöhlen-Ergüssen	19
2.2.6	Verarbeitung von bronchialen Materialien	20
2.2.7	Verarbeitung von Liquor	21
2.2.8	Verarbeitung von Ausstrichpräparaten	21
<b>2.3</b>	<b>Konventionelle zytologische Diagnostik</b>	<b>22</b>
2.3.1	Malignitätskriterien	22
2.3.2	Erstellung der zytologischen Diagnose	24
2.3.3	Diagnostischer Algorithmus der konventionellen Befundung zytologischer Präparate	26
<b>2.4</b>	<b>Adjuvante zytologische Diagnostik mittels Immunzytochemie</b>	<b>27</b>
2.4.1	Ablaufprozesse einer immunzytochemischen Färbung	27
2.4.2	Übersicht der verwendeten Primärantikörper	30
2.4.3	Algorithmen zur Anwendung immunzytochemischer Reaktionen: Markerpanels	39
2.4.3.1	Immunzytochemische Marker im Fall der Tumoridentifikation	40
2.4.3.2	Immunzytochemische Marker im Fall der Tumortypisierung	41
2.4.3.3	Immunzytochemische Marker bei Sonderfällen	42
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Kategorisierung der Fälle in Untergruppen</b>	<b>45</b>

<b>3.2</b>	<b>Aufarbeitung des Patientenkollektivs</b>	<b>47</b>
<b>3.3</b>	<b>Geschlechtsverteilung und Altersverteilung</b>	<b>48</b>
<b>3.4</b>	<b>Überblick des eingesandten und analysierten Materials</b>	<b>49</b>
3.4.1	Auswertung der Pleurapunktate	50
3.4.1.1	Auswertung der männlichen Kohorte - Pleurapunktate	52
3.4.1.1.1	Immunzytochemische Untersuchungen zur Tumoridentifikation - Pleurapunktate bei Männern	52
3.4.1.1.2	Immunzytochemische Auswertung zur Typisierung epithelialer Tumoren - Pleurapunktate bei Männern	53
3.4.1.1.3	Immunzytochemische Auswertung von Fällen bei Verdacht auf malignes Mesotheliom bzw. malignes Lymphom bei Männern	56
3.4.1.2	Auswertung der weiblichen Kohorte - Pleurapunktate	58
3.4.1.2.1	Immunzytochemische Untersuchungen zur Tumoridentifikation - Pleurapunktate bei Frauen	58
3.4.1.2.2	Immunzytochemische Auswertung zur Typisierung epithelialer Tumoren - Pleurapunktate bei Frauen	59
3.4.1.2.3	Immunzytochemische Auswertung von Fällen bei Verdacht auf malignes Mesotheliom bzw. malignes Lymphom bei Frauen	62
3.4.1.2.4	Immunzytochemische Auswertung von Fällen mit ausschließlicher prädiktiver immunzytochemischer Diagnostik an Pleuakarzinosen von Mamma- karzinomen	63
3.4.1.3	Zusammenfassender Überblick der Resultate der immunzytochemischen Untersuchung der Pleurapunktate – männliche und weibliche Kohorte	63
3.4.2	Auswertung der Perikardpunktate	66
3.4.2.1	Immunzytochemische Untersuchungen zur Tumoridentifikation - Perikard- punktate	67
3.4.2.2	Immunzytochemische Auswertungen zur Tumortypisierung - Perikardpunktate	68
3.4.2.3	Zusammenfassender Überblick der Perikardpunktate	68
3.4.3	Auswertung der Feinnadelpunktate (FNP)	69
3.4.3.1	Auswertung der männlichen Kohorte - FNP	70
3.4.3.1.1	Immunzytochemische Untersuchung zur Tumoridentifikation und Tumortypisierung – FNP	70
3.4.3.2	Auswertung der weiblichen Kohorte - FNP	76
3.4.3.3	Zusammenfassender Überblick der Resultate der immunzytochemischen Untersuchung der Feinnadelpunktate	81
3.4.4	Auswertung der Aszitespunktate	81
3.4.4.1	Immunzytochemische Untersuchung zur Tumoridentifikation – Aszitespunktate bei Männern	82
3.4.4.2	Immunzytochemische Auswertung zur Typisierung epithelialer Tumoren – Aszitespunktate bei Männern	83

3.4.4.3.	Immunzytochemische Untersuchungen zur Tumorentifikation – Aszitespunktate bei Frauen	85
3.4.4.4	Immunzytochemische Auswertung zur Typisierung epithelialer Tumoren – Aszitespunktate bei Frauen	86
3.4.4.5	Zusammenfassender Überblick der Resultate der immunzytochemischen Untersuchung der Aszitespunktate – männliche und weibliche Kohorte	87
3.4.5	Auswertung der Douglaspunktate	88
3.4.5.1	Immunzytochemische Untersuchungen zur Tumorentifikation - Douglaspunktate	88
3.4.5.2	Immunzytochemische Untersuchungen zur Tumortypisierung - Douglaspunktate	89
3.4.5.3	Zusammenfassender Überblick der Douglaspunktate	89
3.4.6	Auswertung der bronchoalveolären Lavagen (BAL)	89
3.4.6.1	Immunzytochemische Untersuchungen zur Tumorentifikation - BAL	90
3.4.6.2	Immunzytochemische Untersuchungen zur Tumortypisierung - BAL	92
3.4.6.3	Zusammenfassender Überblick der Resultate der immunzytochemischen Untersuchung der BAL	93
3.4.7	Auswertung der Liquorpunktate	94
3.4.7.1	Immunzytochemische Untersuchungen zur Identifikation epithelialer Tumorzellen - Liquorpunktate	94
3.4.7.2	Immunzytochemische Untersuchungen zur Identifikation und eventuellen Typisierung von lymphatischen Erkrankungen - Liquorpunktate	94
3.4.8	Auswertung des Mundschleimhaut- und des Bindehautabstriches	96
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>97</b>
<b>4.1</b>	<b>Immunanwendungen an Histologie und Zytologie - Gemeinsamkeiten und Unterschiede</b>	<b>97</b>
<b>4.2</b>	<b>Die Rolle der Zytologie und der Immunzytochemie in der morphologischen Diagnostik am Standort Düsseldorf</b>	<b>100</b>
4.2.1	Immunzytochemische Anwendungen zur Tumorentifikation	102
4.2.2	Immunzytochemische Anwendungen zur Typisierung epithelialer Tumoren und zur Abgrenzung gegenüber malignen epithelialen Mesotheliomen	105
4.2.3	Immunzytochemische Anwendungen zur Typisierung nicht-epithelialer Tumoren	110
<b>4.3</b>	<b>Resumée und Ausblick</b>	<b>112</b>
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>116</b>

## 1. Einleitung

Aus der diagnostischen Pathologie sind adjuvante Untersuchungsmethoden, mit denen die konventionelle Diagnostik ergänzt wird, schon lange nicht mehr wegzudenken. Dazu gehören neben Sonderfärbungen (z.B. PAS, Berlinerblau, EvG oder Versilberungstechniken) immunologische und molekulare Verfahren.

Überwiegend sind diese Methoden für histologische Präparate, also für Gewebeschnitte, konzipiert und standardisiert worden. Dies gilt auch für die in dieser Arbeit zur Debatte stehenden immunologischen Anwendungen, für die sich in der Histologie der Begriff der "Immunhistochemie" etabliert hat. Parallel dazu gibt es aber auch die "Immunzytochemie" an zytologischen Ausstrichpräparaten oder Zentrifugaten, die überwiegend an Schwerpunktinstituten mit größerem zytologischen Eingangsmaterial angewandt wird. Zu solchen Einrichtungen gehört auch der Funktionsbereich Cytopathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf, an dem diese Arbeit entstanden ist. Für Einrichtungen mit wenig Zytologie kommt die Etablierung einer Immunzytochemie meistens nicht in Betracht, weil hierfür aufwendige Modifikationen an den immunologischen Verfahren notwendig wären, die den Aufwand nicht lohnen. Als Ersatz wird dann häufig auf immunhistochemische Verfahren an sogenannten Zellblöcken zurückgegriffen, die man von ergänzend zu den primär hergestellten Sedimentausstrichen von Flüssigkeitsaspiraten (Ergüsse, Liquor etc.) gewinnen kann. Primär als Ausstriche gefertigte Präparate von Feinnadelpunktaten oder Bürstungen von epithelialisierten Oberflächen (Mundhöhle, Gallenwege etc.) sind dann aber immunologisch nicht zugänglich.

Am Funktionsbereich Cytopathologie in Düsseldorf, einer der größten Einrichtungen für extragynäkologische Zytologie in Deutschland, wird überwiegend an Ausstrichpräparaten gearbeitet, weniger an Zellblöcken. Es macht daher Sinn, die dort gemachten breiten Erfahrungen mit der Methode systematisch aufzuarbeiten. In dieser Arbeit soll es darum gehen, die immunzytochemischen Ergebnisse eines definierten Untersuchungszeitraums auszuwerten.

## 1.1 Die Immunzytochemie – Grundlagen

Die Immunzytochemie stellt im Bereich der Zytopathologie eine bis heute unverzichtbare adjuvante Labortechnik dar. Sie hat sich ergänzend zur konventionellen zytologischen Diagnostik entwickelt und findet insbesondere Verwendung bei der Identifizierung und Klassifizierung von Tumoren. In manchen Anwendungen erlaubt sie eine prognostische Vorhersage des klinischen Verlaufs und eine Einschätzung auf das Ansprechen bestimmter Therapien. Außerdem kann sie zum Nachweis von Infektionserregern wie zum Beispiel *Helicobacter pylori* oder *Herpes simplex* eingesetzt werden, ebenso zum Nachweis einer transformierenden HPV-Infektion. Methodisch geht die Immunzytochemie auf eine spezifische Detektion von Proteinen (Antigenen) auf Zellen und Zellbestandteilen (Zellkern, Zellmembran und Zytoplasma) durch die Bindung und Visualisierung möglichst spezifischer Antikörper zurück.

Durch die stetige Weiterentwicklung von Antikörpern besitzt die Immunzytochemie nach wie vor einen hohen Stellenwert in der morphologischen Tumordiagnostik und auch der damit verbundenen Planung des Weiteren therapeutischen Vorgehens für den Patienten. Beispielsweise sind die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus für Östrogen (ER) und Progesteron (PR) sowie die Untersuchung des HER-2/neu-Status unerlässlich für die Planung adjuvanter Therapiekonzepte beim Mammakarzinom (Leitlinienprogramm Onkologie 2021) und können auch an zytologischen Präparaten, insbesondere an Ergusskarzinosen, im klinischen Verlauf vorgenommen werden, wenn es darum geht, in metastasierter Situation ggfls. Rezeptorkonversionen zu detektieren und Therapieumstellungen vorzunehmen.

### 1.1.1 Antigen-Antikörper-Reaktion / Immunreaktion

Die Grundlagen einer immunzytochemischen Untersuchung beruhen auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion. Auf den menschlichen Organismus bezogen entsprechen Antikörper Proteinen, welche zum Immunsystem des menschlichen Körpers zählen und von den Plasmazellen als Immunantwort nach Kontakt mit ei-

nem Antigen gebildet werden. Antigene hingegen sind in diesem Kontext Substanzen (körperfremde Stoffe), welche eine spezifische Bindung mit einem Antikörper nach dem sogenannten *Schlüssel-Schloss-Prinzip* (Abb.1) eingehen können und letztlich einen Immunkomplex bilden, der zur Inaktivierung des Antigens führt. Dieser Mechanismus entspricht einer natürlichen Abwehrreaktion des menschlichen Organismus auf körperfremde Substanzen.

Die Labortechnik der Immunzytochemie folgt ebenfalls dem Prinzip der Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes, insofern als dass ein mit einem Farbstoff gekoppelter Antikörper an eine Bindungsstelle eines hier körpereigenen Antigens, dem zelleigenen Epitop, spezifisch bindet (Abb. 1). Über die Zugabe eines Substrates wird der Komplex farblich kenntlich gemacht. Das Resultat kann lichtmikroskopisch oder im Fall der Immunfluoreszenzfärbung an einem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden.

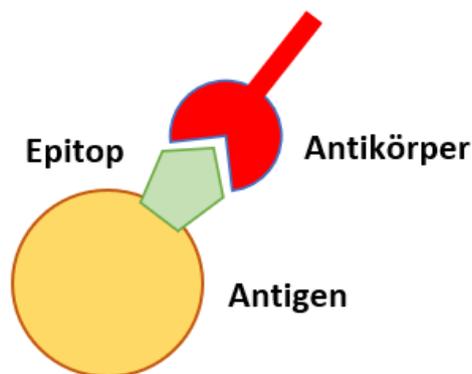


Abb.1: Darstellung eines Immunkomplexes aus einem Antigen und seinem Epitop und einem spezifisch an diesen bindenden Antikörper (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Modifiziert nach Dabbs (2019)

### **1.1.2. Methoden der Immunzytochemie – direkte, indirekte Methode, ABC-Methode**

Es existieren verschiedene Methoden, welche sich über die Jahre weiterentwickelt haben, um Antigene im Rahmen einer immunzytochemischen Untersuchung sichtbar zu machen.

Dazu gehören unter anderem die direkte und die indirekte Methode. Bei der direkten Methode bindet der spezifische Antikörper direkt an das Epitop eines Antigens, über die Zugabe eines Substrates wird der Komplex sichtbar gemacht, während bei der indirekten Methode ein Primärantikörper an das Epitop des Antigens bindet und ein farblich markierter Sekundärantikörper, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet ist, wiederum an diesen bindet (Abb. 2). Auch bei der indirekten Methode wird der Komplex über die Zugabe eines Substrates sichtbar gemacht. Zur Verfügung stehen hier für beispielsweise fluoreszierende Marker oder Enzyme (Dabbs 2019).

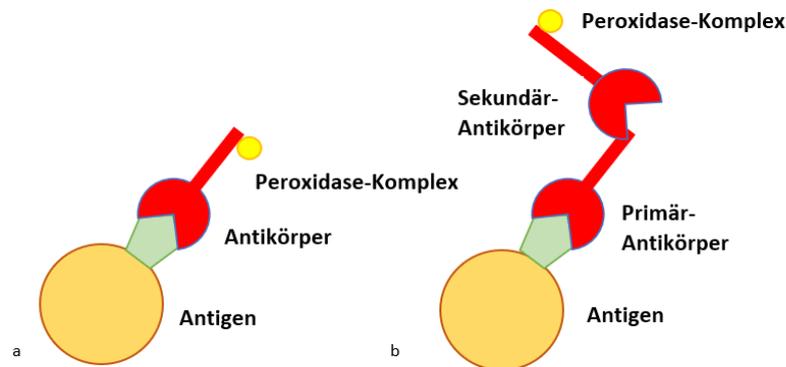


Abb.2: Schematische Darstellung der direkten (a) und indirekten (b) Methode. Modifiziert nach Dabbs (2019)

Der Vorteil der direkten Methode liegt in dem Gebrauch eines einzigen Antikörpers, sodass diese Methode schnell durchführbar erscheint und zudem zu weniger unspezifischen Bindungen führt, der Nachteil liegt wiederum in einer geringen Signalstärke bei Proben mit wenigen Antigenen. Das zweistufige System der indirekten Methode verringert das Problem der Signalintensität, jedoch wird hier das Potential unspezifischer Bindungen erhöht, was wiederum zu störenden Hintergrundsignalen führen kann und dann die Diagnostik erschweren kann.

Eine der am häufigsten verwendeten immunzytochemischen Methoden, welche auch am Funktionsbereich Cytopathologie des Universitätsklinikums in Düsseldorf benutzt wird, ist die ABC (Avidin-Biotin-Komplex) - Methode (Abb. 3). Das Prinzip beschreibt eine starke Bindung eines biotinylierten Sekundärantikörpers, eines Komplexes bestehend aus Avidin, Biotin und einem Enzym, der Peroxidase, welcher an den an das Antigen gekoppelten Primärantikörper bindet (Hsu et al 1981).

Der Vorteil liegt hier in der stark affinen Bindung zwischen Avidin und Biotin, sodass unspezifische Bindungen kaum zustande kommen.

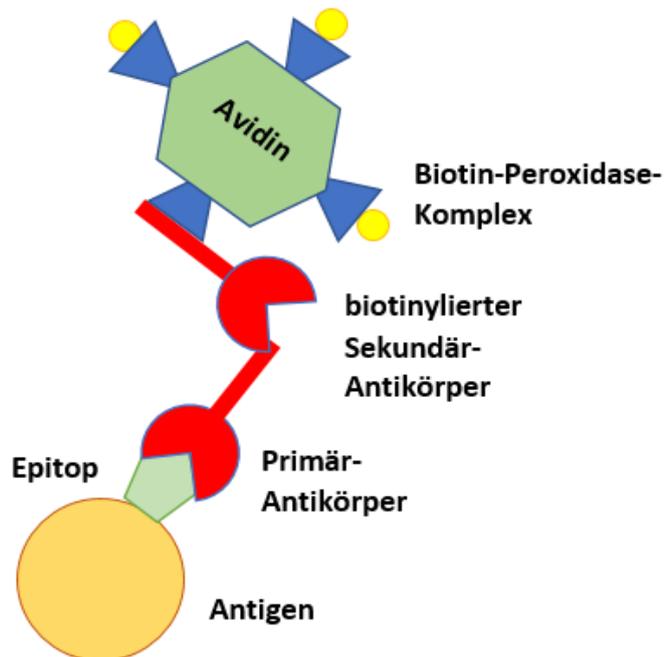


Abb. 3: Schematische Darstellung der ABC-Methode, modifiziert nach Dabbs 2019

### 1.1.3. Besondere methodische Aspekte der Immunzytochemie

Immunzytochemische Untersuchungen an Ausstrichen oder Sedimentausstrichen unterscheiden sich in mehrerer Hinsicht methodisch von immunhistochemischen Untersuchungen an Schnitten von Paraffinblöcken.

Zum einen ist die Zahl der Präparate, die die zu analysierenden Zellen aufweisen, in aller Regel stark limitiert. Manchmal liegen nur ein einziger oder vielleicht zwei Ausstriche mit solchen Zellen vor - was bedeutet, dass man sich dann vorher sehr genau überlegen muss, welche Antikörper man einsetzen möchte. Im Unterschied hierzu kann man von einem ca. 4 mm breiten Gewebe, das in einem Paraffinblock eingebettet ist, theoretisch 500 bis fast 1000 Schnitte à 3-4 µm Stärke anfertigen - so dass dem Einsatz von Antikörpern in der Immunhistochemie faktisch keine Grenzen gesetzt sind.

Außerdem kann eine mangelhafte Handhabung des Materials in Klinik oder Pathologie dazu führen, dass die Bindungsaffinität der Antikörper herabgesetzt ist bzw. eine Bindung sogar völlig ausbleiben kann. Somit ist ein qualitativ und quantitativ gutes Ergebnis von einer guten Gesamtbearbeitung des Materials abhängig. Hierzu gehören die Fixierungsart und Fixierungsdauer, des Weiteren die Laborbedingungen bei der Anwendung der Immunreaktion bzgl. beispielsweise Temperatur, pH-Wert der Lösungen und Inkubationszeiten. Besonders störend sind Trocknungsartefakte bei der Aufbringung von Punktaten auf Objektträger, die manchmal vom Punkteur aber nicht vollständig vermieden werden können.

Wissen muss man auch, dass nicht von jedem beliebigem konventionell gefärbtem Präparat eine immunzytochemische Färbung möglich ist. Dies gilt insbesondere nach vorheriger MGG-Färbung (May-Grünwald-Giemsa), nach der keine Immunzytochemie mehr verlässlich gelingt. Diese Färbung wird für luftgetrocknete Präparate empfohlen, z.B. für Knochenmarkpunktate oder Schilddrüsenpunktate.

Schließlich muss bedacht werden, dass es anders als in der Immunhistochemie in aller Regel nicht möglich ist, externe Kontrollen mitzuverwenden, gerade bei Ausstrichpräparaten. Dies bedeutet, dass bei positivem Färbesignal in der Immunreaktion genau geschaut werden muss, ob sich auch die typischen Zellen anfärben (z.B. normale Mesothelien bei der Verwendung von Calretinin). Bei negativem Färbesignal muss (oft im Kontext mit anderen Markern) überlegt werden, ob die zu interpretierenden Zellen wirklich negativ reagiert haben oder ob möglicherweise die Reaktion technisch nicht funktioniert hat. Dementsprechend muss beim Befunder ein gutes zytomorphologisches Wissen vorausgesetzt werden.

Ansonsten sind fast alle Anwendungen, die man von der Immunhistochemie gewohnt ist, auch immunzytochemisch möglich. Eine Ausnahme stellen Fragestellungen dar, bei denen es auch oder ausschließlich auf die Beurteilung einer Immunreaktion bezogen auf eine bestimmte topographische Position im Gewebe ankommt. So sind Bestimmungen zum PD-L1-Status immunzytochemisch prinzipiell möglich, aber auf die Tumorzellen beschränkt. Bestimmungen, die sich auf die die Tumorzellen begleitenden lymphatischen Zellen bezogen, sind aber nicht möglich, weil man nicht sagen kann, wo eine auf einem Objektträger liegende Einzelzelle einmal

im Gewebe gelegen hat. Beispiele für Tumorentitäten, bei denen tumorinfiltrierende Lymphozyten einen bedeutenden prognostischen und prädiktiven Einfluss haben, wären das Urothelkarzinom, das Magenkarzinom, Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (Erstlinientherapie), das metastasierte Zervixkarzinom (Schildhaus 2018) und das Mammakarzinom (Schmidt 2020).

Ferner kann problematisch sein, dass bestimmte Immunanwendungen im Grunde nur in ihrem diagnostischen oder prädiktiven Aussagewert für Histologie validiert sind und dennoch an Zytologie angewandt werden müssen. Dieses ist nicht nur für PD-L1 der Fall, sondern insbesondere auch für HER-2/neu. Hierbei handelt es sich um eine Färbereaktion an der Zellmembran der Tumorzellen, von deren Ausfall die Anwendung einer Antikörpertherapie mit Trastuzumab oder Lapatinib abhängt. In der Zytologie findet diese Bestimmung Anwendung an Tumor-positiven Präparaten von Körperhöhlenergüssen, vor allem bei Pleurakarzinosen von Mammakarzinomen. Die Untersuchung gelingt nicht nur an formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeproben, sondern kann auch immunzytochemisch an aufbereiteten Zellblöcken von z.B. Feinnadelaspiraten oder serösen Flüssigkeiten mit guten Ergebnissen trotz der geringen Zellmenge (Shabaik et al. 2011) (Francis et al. 2016) oder an Sedimentausstrichen gut durchgeführt werden.

#### **1.1.4. Indikation und Stellung der Immunzytochemie im diagnostischen Ablauf**

Die Immunzytochemie dient in der Diagnostik der Cytopathologie und auch grundsätzlich nicht als primäre Methode, um benigne und malignen Zellen zu identifizieren oder Tumorzellen zu typisieren, sondern sie versteht sich als adjuvante Methode nach bzw. neben der klassischen konventionellen zytologischen Diagnostik. An dieser Stelle möchte betont sein, dass sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit einer Datensammlung extragenitaler Untersuchungsmaterialien beschäftigt, daher wird der Schwerpunkt hinsichtlich der Erklärung der zytologischen Routinediagnostik ausschließlich auf jenes Untersuchungsgut gelegt.

Grundsätzlich erfolgt die Aufarbeitung der eingesandten Proben nach einem standardisierten diagnostischen Verfahren. Hierzu dient als Nomenklatur eine standardisierte Befunderstellung, welche für die extragenitale Zytologie konzipiert worden ist (Böcking 1998) und ausführlich im Kapitel 2.2.2 erläutert wird.

Die Basis für eine immunzytochemische Untersuchung legt die mikroskopische Beurteilung eines Präparates. Hierbei werden morphologisch die Zellen und Zellpopulationen beurteilt und vorab auf benigne, maligne oder verdächtig hin bewertet. Das zu untersuchende Materialspektrum lässt in der zytologischen Routinediagnostik eine Einteilung in Ausstriche / Abstriche (z.B. Bronchialbürstung, Gallenwegsbürstung, Mundschleimhautabstrich) und Flüssigkeiten (z.B. Ergüsse der serösen Höhlen) zu. Bevor die Proben mikroskopisch begutachtet werden können, bieten sich nach Durchführung spezieller Materialverarbeitungsprozesse unterschiedliche Färbungen der zytologischen Präparate an (Pokieser 2001). Hierbei unterscheidet man Routinefärbungen, von Spezialfärbungen und adjuvante Untersuchungsprozesse wie zum Beispiel ergänzende immunzytochemischen Färbungen. Zu den Routinefärbungen der klassischen zytologischen Diagnostik zählen die May-Grünwald-Giemsa-Färbung (MGG) und die Papanicolaou-Färbung (PAP), welche auch parallel an Präparaten des gleichen Materials angewandt werden können.

Abhängig von zusätzlichen Fragestellungen oder in Zusammenschau wichtiger klinischer Angaben bieten sich in Ergänzung der Routinefärbungen Spezialfärbungen an. So kann zum Beispiel eine PAS-Reaktion durchgeführt werden, wenn in auffälligen Zellen der Inhalt von Vakuolen untersucht werden soll. Mit Hilfe der PAS-Reaktion lässt sich zeigen, ob der vermeintliche Tumor gegebenenfalls Muzin (Schleim) enthält (Sun et al. 2018). Auch hinsichtlich infektiöser Fragestellungen lassen sich mit der PAS-Reaktion potentiell pathogene Pilze nachweisen. Diese ergänzende Färbungen können in der Karzinomdiagnostik hilfreich sein, jedoch ist ihre Spezifität und Sensitivität begrenzt (Silverman et al. 1987). Allerdings sollte die Auswahl geeigneter Färbungen immer gut überlegt werden, da unter Umständen verhältnismäßig wenig Untersuchungsmaterial zur Verfügung stehen kann und nicht immer ein zuvor gefärbtes Präparat technisch sinnvoll umgefärbt werden kann.

Nach Anfertigung der konventionellen Färbungen erfolgt grundsätzlich eine mikroskopische Begutachtung, die oft schon genügt, um ein Präparat abschließend zu

befunden. Es kommen aber Fälle vor, die nicht rein auf der Basis der konventionellen Färbungen abschließend beurteilt werden können und entsprechend als zunächst „unklar“ eingeordnet werden müssen. Mit Hilfe von adjuvanten diagnostischen Verfahren bieten sich jedoch Möglichkeiten, derart unklarer Fälle zu Gunsten einer definitiven Diagnose zu reduzieren. Dabei kommen multimodale adjuvante Untersuchungsmethoden in Frage (Mohanty und Dey 2003), wobei die Immunzytochemie die am häufigsten angewandte Methode war bzw. immer noch ist. In einer Arbeit aus der Cytopathologie in Düsseldorf wurde bereits früh die diagnostische Treffsicherheit der konventionellen Zytologie genauer beleuchtet (Motherby et al. 1999). Dabei wurde an 300 Pleurapunktaten und 300 Aszitespunktaten die zytologischen Diagnosen mit den klinischen und histologischen Follow-up's der Patienten verglichen. Den Ergebnissen zu entnehmen, lag die Sensitivität der zytologischen Diagnostik für die Pleurapunktate bei 50,0%, die Spezifität bei 97,0%, der positive Vorhersagewert bei 95,7% und der negative Vorhersagewert bei 86,4%. Für die Aszitespunktate betragen die Sensitivität 62,4%, die Spezifität 98,0%, der positive Vorhersagewert 100% und der negative Vorhersagewert 88,3%. Für die Pleurapunktate fielen 5,8% und bei den Aszitespunktaten 4,4% der Diagnosen zweifelhaft oder verdächtig auf einen Tumor aus. Die falsch-positiv Rate lag bei 0,5% und die falsch-negativ-Rate 31,5%. Die diagnostische Treffsicherheit der Ergusszytologie erwies sich als unbefriedigend, sodass eine Empfehlung zur Anwendung adjuvanter Methoden, zur Verbesserung insbesondere der Sensitivität (Detektionsrate maligner Zellen) und zur Minimierung der Falsch-negativ-Rate ausgesprochen wurde.

Unter Berücksichtigung weiterer Studien (Böcking et al. 2000) über Jahre hinweg konnte gezeigt werden, dass die klassische Ergusszytologie bei der Identifikation maligner Zellen eine Sensitivität von fast 60% mit einer Spezifität von 97% erzielen konnte. In Anwendung ergänzender adjuvanter Untersuchungsmethoden, wie der Immunzytochemie und DNA-Zytometrie konnte die Sensitivität, gemessen an einem Kollektiv von 313 Ergüssen um 7,6 Prozent und die Spezifität um 5,4 Prozent gesteigert werden (Böcking et al. 2000). Eine andere Arbeitsgruppe konnte an einem Untersuchungsgut, bestehend aus 1234 Ergüssen, 561 maligne Ergüsse als richtig positiv klassifiziert werden, die Sensitivität lag bei 93% (Metzgeroth et al. 2008). Eine weitere Arbeit belegt, dass allein durch die Immunzytochemie der Bestand unklarer Fälle um 1/3 reduziert werden konnte (Biesterfeld et al 2013).

Wesentlich bei der Erreichung des Ziels, die Zahl unklarer Fälle weitestgehend zu minimieren, ist dabei, nicht ungezielt vorzugehen, sondern mithilfe einer Paneldiagnostik die Fragestellungen des jeweiligen Falles gezielt einzugrenzen und zu beantworten. Die Panels berücksichtigen Markerkombinationen, die sich im diagnostischen Alltag in ähnlich gelagerten Fällen in Histologie oder Zytologie bewährt haben und die parallel oder in mehreren diagnostischen Schritten nacheinander angewendet werden können.

### Immunzytochemische Anwendungen zum Tumorzellnachweis

Die Literatur zeigt eine fließende Entwicklung der Markerpanels über die Zeit. Vor 30 Jahren wurden in einem Panel zur Identifikation maligner Zellen in serösen Ergüssen (n=55) der Pleura, des Peritoneums und des Perikards, neben CEA, EMA, CK, LCA, S100, Vimentin, Leu-M1 und B72.1 eingesetzt (Nance und Silverman 1991). Von den 55 Proben waren 28 tumornegativ, während 26 Adenokarzinome und ein Mesotheliom identifiziert wurden. Während bei den Adenokarzinomen die Marker EMA, CEA, Leu-M1 und B72.3 positiv waren, reagierten die Mesothelien Vimentin-positiv. CK identifizierte 93% der malignen epithelialen Zellen, wobei zu beobachten war, dass einige Mesothelien ebenfalls positiv markiert wurden. 3 der 26 identifizierten Karzinomfälle wurden erst über den Einsatz der Immunmarker erkannt und waren in den konventionellen Färbungen zytologisch nicht gesehen worden. Lediglich in einer der 26 Tumorproben fiel das Immunpanel falsch-negativ aus. Somit zeigte sich seinerzeit bereits ein hilfreiches Immunmarkerpanel zur Abklärung seröser Ergüsse, welches sich vor allem bei atypischen, proliferierenden Mesothelien und klinischem Malignitätsverdacht, bei negativen konventionell-zytologischen Befunden oder nur sehr wenig vorliegenden malignen Zellen anbot. Gerade die Abklärung von Adenokarzinomen und malignen Mesotheliomen, versus reaktiven Mesothelien war immer wieder Gegenstand und ist bis heute noch von Interesse mehrerer Studien. Lee et al zeigte, dass die monoklonalen Antikörper CEA, EMA und Fibronectin zunächst einen guten Ansatz zur Unterscheidung zwischen reaktiven Mesothelien und Karzinomzellen in serösen Ergüssen seien (Lee et al. 1996), während in einer anderen Studie (Subbarayan et al. 2019) die Kombination von MOC-1 und Calretinin sich als nützliche Zweierkombination etablierte. Eine weitere aktuelle

Studie kam zu dem Fazit, dass der Einsatz der Immunmarkerkombination von Calretinin und BerEP4, einem Marker aus der EpCAM-Gruppe (*epithelial cell adhesion molecules*) nicht nur den Aspekt der Kostenersparnis mit sich bringt, sondern auch einen hohen positiven und negativen prädiktiven Wert zeigte, wenn es um die Unterscheidung zwischen reaktiven Mesothelien und einem Adenokarzinom geht (Khurram et al. 2019): An 97 klinisch-radiologisch nachgewiesenen Peritoneal- und Pleuraflüssigkeiten von Patienten mit Verdacht auf maligne seröse Ergüsse wurde die diagnostische Treffsicherheit unter Verwendung der beiden Marker berechnet. Die Sensitivität der Untersuchung für BerEP4 lag bei 98,6%, die Spezifität und der positive Vorhersagewert jeweils bei 100% und der negative Vorhersagewert bei 96%. Somit lag die diagnostische Treffsicherheit für BerEP4 bei 98,9%. Hingegen betrug die Sensitivität für Calretinin 79,2%, die Spezifität sowie der positive Vorhersagewert jeweils 100%, wobei der negative Vorhersagewert 93,6% und die diagnostische Treffsicherheit bei 94,8% lag.

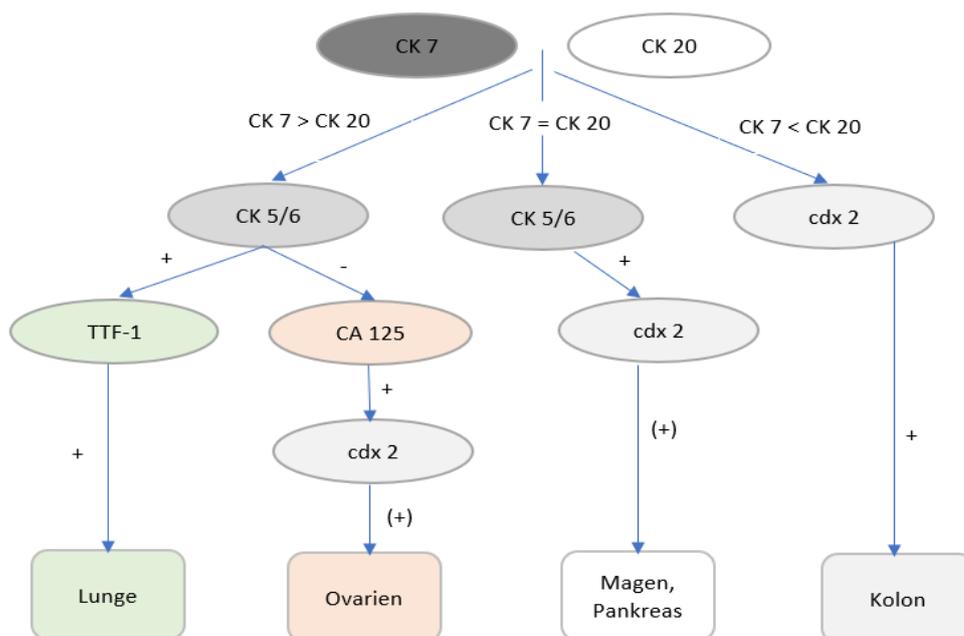
#### Immunzytochemische Unterscheidung epithelialer und mesothelialer Zellen

Für die primäre Unterscheidung zwischen epithelialen Zellen und mesothelialen Zellen wird am Funktionsbereich Cytopathologie eine Kombination aus Calretinin und dem EpCAM-Marker BerEP4 vorgenommen, zum Teil ergänzt durch andere Marker wie WT-1 oder Podoplanin (D2-40) bzw. weitere EpCAM-Marker (z.B. HEA-125 oder MOC-31). Bei klarer EpCAM-Positivität und Calretinin-Negativität kann von Epithelzellen und dabei im Falle von Ergusspräparationen regelhaft von Zellen eines (Adeno-)karzinoms ausgegangen werden, bei klar umgekehrtem Markerausfall sind die Zellen dem Mesothel als Herkunft zuzuordnen. Ob sie reaktiver Natur oder Zellen eines malignen Mesothelioms sind, ist dabei allerdings immunzytochemisch nicht zu klären und bedarf des Einsatzes anderer adjuvanter Methoden (FISH, DNA-Bildzytometrie, AgNOR-Histochemie). Andere Marker wie insbesondere EMA, Mesothelin oder WT-1 können in der Immunzytochemie ergänzend hinzugenommen werden, wenn die oben genannten Reaktionen nicht ganz eindeutig unterscheiden lassen. Das Markerpanel, das 2009 verwendet wurde, ist im Methodenteil in Abb. 15 graphisch wiedergegeben. Unter Hinzuziehung auch der in Klammern oben ge-

nannten Methoden ließ sich die Zuordnung von Tumordinfiltraten zu malignen Mesotheliomen in Abgrenzung zu Adenokarzinomen von gut 80% auf 100% steigern (Onofre et al. 2008b).

### Immunzytochemische Anwendungen zur Tumortypisierung

Ist hingegen bei einem malignen Tumor eine Typisierung gefragt, so lassen sich ergänzend organtypische Marker als Panel einsetzen. In Abb. 4 ist ein solches weiteres, in Düsseldorf entwickeltes diagnostisches Panel zur immunzytochemischen Typisierung häufiger Adenokarzinome bei klinischem CUP-Syndrom wiedergegeben (Pomjanski et al. 2005). Der in Abbildung 4 noch enthaltene Marker CA125 würde heute durch PAX-8 oder WT-1 ersetzt, außerdem würde man ggfls. noch GATA-3 oder TRPS1 als sensitive Marker für Mammakarzinome hinzunehmen.



**Abb. 4:** Algorithmus aus dem Funktionsbereich Cytopathologie für die Anwendung und Interpretation immunzytochemischer Marker zur beispielhaften Subtypisierung von Adenokarzinomen der Lunge, der Ovarien und des Magen-Darm-Traktes (modifiziert nach Pomjanski et al. 2005)

Der algorithmische Ablauf zeigt, wie man mit differentiellen Zytokeratinen beginnend (CK7, CK20, CK5/6) ein Adenokarzinom zunächst grob zuordnet, um dann mit dem Einsatz organtypischer Marker (TTF-1, cdx-2) bis zum spezifischen Organtumor voranzukommen. Einsetzen würde man das komplette Panel allerdings nur,

wenn sich in der konventionellen Zytologie kein morphologischer Hinweis auf einen bestimmten Primärtumor ergeben hätte und wenn anamnestisch kein Tumorleiden bekannt ist. In beiden Fällen würden dann Elemente des Panels gezielter eingesetzt. Andererseits kann es auch abhängig von der klinischen oder zytologischen Fragestellung um diverse weitere Antikörper ergänzt werden<sup>1</sup>.

In einer wissenschaftlichen Studie, in der das Markerpanel an serösen Ergüssen mit CUP-Syndrom klinisch erprobt wurde, ergab sich im Vorfeld der Planung dieser Arbeit in 85,4% der 180 Fälle eine Identifikation des Primärtumors, im Besonderen bei Ovarialkarzinomen (94,8%) (Pomjanski et al. 2005). Ähnlich war auch an 62 Lebermetastasen in gut 90% der Fälle eine klare Tumorzuordnung möglich (Onofre et al. 2007), ebenso an 25 Fällen von Lymphknotenmetastasen in hier 92% der Fälle (Onofre et al. 2008a).

## 1.2 Ziele der Arbeit

Die Immunhistochemie ist in der Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf etabliert und findet, ähnlich wie in der Histopathologie auch, in der täglichen Routinediagnostik regelmäßige Anwendung. Dabei werden immer wieder neue, von der Industrie angebotene Marker erprobt und bei diagnostischem Wert auch auf Dauer etabliert. Im Prinzip wurden hierfür "theoretische" Entscheidungswege definiert, nach denen man die Indikation zu einer immunzytochemischen Untersuchung, die ja stets eine ergänzende, aber keine primäre Methode ist, stellt. Diese wurden auch in wissenschaftlichen Studien retrospektiv überprüft.

Es wurde aber bisher noch nicht der Frage nachgegangen, wie sich diese Entscheidungswege im „täglichen Leben“, also abseits wissenschaftlicher Studien, darstellen, unter welchen Bedingungen sie individuell verändert werden und wie oft Einzelfälle vorliegen, die sich den empfohlenen Entscheidungswegen entziehen und die

---

<sup>1</sup> Ähnliche Ansätze gab es ursprünglich zu etwa gleicher Zeit auch in der Labormedizin, beispielsweise durch die Bestimmung von Tumormarkern per Immunoassay in malignen Pleuraergüssen (CEA, CA15-3, CA 19-9, CA72-4, CK19, NSE, SCC). Innerhalb der Gruppen der Adenokarzinome, der Plattenepithelkarzinome und der Kleinzeller sowie der Mesotheliome ergab sich bei 199 Fällen eine korrekte Zuordnung in knapp 90% der Fälle, bei der ergänzenden Subtypisierung der Adenokarzinome von fast 65% (Miédougé et al. 1999).

somit individuell beurteilt werden müssen. Vielmehr hat man sich bisher darauf fokussiert, immunhistochemische Untersuchungsreihen nur nach Organen oder nach bestimmten Tumorentitäten, das heißt „vertikal“, auszuwerten.

Ziel dieser Arbeit ist eine longitudinale Auswertung vorzunehmen, wobei alle Untersuchungen aus dem Jahr 2009 bezüglich der Indikationsstellung und Indikationsdurchführung zur immunzytochemischen Untersuchung nachverfolgt wurden, um somit dem „Status quo“ der Indikationsstellung und Indikationsdurchführung der Immunzytochemie zu eruieren.

Zu der vorliegenden Dissertation liegt ein Ethikvotum seitens der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität vor (Nr. 4941 vom 30.1.2015).

## **2. Material und Methodik**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1. Datensatz - Inhalt und Bearbeitungsgrundlage**

Die vorliegende Arbeit umfasst eine explorative Datenanalyse beruhend auf der retrospektiven und statistisch deskriptiven Auswertung von insgesamt 376 Patienten für das Jahr 2009 aus dem Institut für Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Für den Datensatz wurden ausschließlich extragynäkologische Untersuchungsmaterialien berücksichtigt, bei welchen die adjuvante Methode der Immunzytochemie Anwendung gefunden hat. Die Datenaufnahme und -analyse der Indikationsstellung und Indikationsdurchführung der Immunzytochemie erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel (Version 16.0, 2019). Alle Daten wurden durch Tabellen bzw. Diagramme veranschaulicht.

#### **2.1.2 Patientenkollektiv**

In der Datenbank der im Funktionsbereich Cytopathologie verwendeten Software dc-pathos (Firma dc-systeme, Heiligenhaus, heute Teil der Firma Nexus) wurden die Daten aller Patienten recherchiert, deren Proben im Jahr 2009 adjuvant immunzytochemisch untersucht worden waren.

Die Proben stammten von insgesamt 57 Einsendern, welche sowohl aus Düsseldorf und der näheren Umgebung als auch aus entfernteren Regionen stammten. Das eingesandte Untersuchungsmaterial umfasste hierbei ein umfangreiches Spektrum, bestehend aus Pleurapunktaten (n = 189), Feinnadelpunktaten (FNP) diverser Organe (n = 93), Aszitespunktaten (n = 62), Bronchialsekreten und Bronchialbürstungen (n = 12), Perikardpunktaten (n = 9), Liquorpunktaten (n = 5) und Douglasraumpunktaten (n = 4) sowie einem Mundschleimhautabstrich (n = 1) und einem Bindehautabstrich (n = 1). Doppeluntersuchungen bei verschiedenen Einsendungen identischer Patienten kamen nicht vor, so dass sich die 376 Proben auch auf 376 Patienten beziehen.

## 2.2. Methodik

### 2.2.1 Grundlegende Arbeitsschritte der zytologischen Routinediagnostik

Die Indikation für eine immunzytochemische Untersuchung ergibt sich aus dem Ergebnis der konventionellen zytologischen Diagnostik. Hierbei unterliegt das eingesandte Untersuchungsmaterial einem standardisierten Aufarbeitungsprozess, gemäß den jeweiligen institutsinternen *Standard Operating Procedure* (SOP).

Für native Körperhöhlen-Ergüsse, wie z.B. Pleura- und Perikardergüsse, sowie Aszites und für Spülflüssigkeiten vom Douglasraum und Peritoneum wird eine Probenmenge von 50-100ml empfohlen. Für die broncho-alveoläre Lavage (BAL) empfiehlt sich die Probengewinnung über die Instillation von ca. 100 ml physiologischer Kochsalzlösung, wobei die Rückgewinnungsrate der Spülflüssigkeit 25-60% betragen sollte. Diese Materialien werden als Flüssigkeit in die Cytopathologie eingesandt und dort nach Zentrifugation zur Zellanreicherung standardisiert weiterverarbeitet.

Für Feinnadelpunktate ("Nadelbiopsien") liegen ebenfalls Vorgaben und Empfehlungen vor, wie man mit einer frei geführten Kanüle oder beispielsweise mit einem Binder-Ventil die Läsion treffen kann und dann mit einer aufgesetzten Spritze im Unterdruck über den Aspirationssog und eine kombinierte fächerförmig-stochernde Technik Material gewinnen kann (Pokieser et al. 2001). Danach werden die entnommenen Zellen seitens des punktierenden Arztes direkt auf Objektträger aufgetragen und alkoholfixiert eingesandt. Gleiches gilt für Zellen, die bei Abstrichentnahmen und Bürstungen (Mund, Bindehaut, Lunge) gewonnen werden; auch sie werden direkt auf Objektträger ausgestrichen und alkoholfixiert.

Materialspezifisch werden dann Routinefärbungen vorgenommen, z.B. eine Papanicolaou-Färbung für Feinnadelpunktate und Bürstenausstriche oder eine Papanicolaou- und eine MGG-Färbung für die in der Cytopathologie hergestellten Sedimentausstriche von Ergusspräparationen. Andere konventionelle Färbungen (PAS, Eisenfärbung, HE-Färbung) werden in Düsseldorf nicht routinemäßig angefertigt, sind aber bei nachträglich bei entsprechender klinischer Indikation durchführbar.

## 2.2.2 Zytologische Färbung nach Papanicolaou

Die Pap-Färbung ist eine Standardfärbung für alkoholfixierte zytologische Präparate in der genitalen und extragenitalen Zytologie. Der Vorteil dieser Färbung liegt in der sehr guten Darstellbarkeit des Kernchromatins, daher eignet sich diese Färbung insbesondere in der Diagnostik maligner Zellen. Sie erfolgt nach einem standardisiertem Färbeprotokoll unter Verwendung dreier Farbstoffe (Hämatoxylin, Orange II2b und Polychrom) sowie sequentiell zwischengeschalteten Fixierungs- und Waschprozessen gefärbt (Tab. 1) und führt zu charakteristischen Färbungen in den verschiedenen Zellkompartimenten (Tab. 2).

Färbeschritte	Inhalt der Küvetten	Inkubationszeit
1	96% Ethanol	2 Min
2	96% Ethanol	1 Min
3	70% Ethanol	1 Min
4	50% Ethanol	1 Min
5	Aqua dest.	1 Min
6	Hämatoxylin	2 Min
7	Leitungswasser	3 Min
8	Leitungswasser	3 Min
9	NH <sub>2</sub> OH	1 Min
10	70% Ethanol	1 Min
11	70% Ethanol	1 Min
12	80% Ethanol	1 Min
13	96% Ethanol	1 Min
14	Orange II 2b	2 Min
15	96% Ethanol	1 Min
16	95% Ethanol	1 Min
17	Polychrom 3b	2 Min
18	96% Ethanol	1 Min
19	95% Ethanol	1 Min
20	99,5% Ethanol	2 Min
21	Tissue clear	1 Min
22	Tissue clear	1 Min

Tabelle 1: Zytologische Färbung nach Papanicolaou gemäß interner SOP

Zellkompartiment	Farbliche Darstellung
Kerne	dunkelviolet, besonders gut erhaltene Kernstruktur
Nukleolen	rot
Erythrozyten	rot
Zytoplasma	blaugrün bis orange abhängig von der Dichte
Schleim	hellbasophil

Tabelle 2: Spezifische Färbeleistung der Pap-Färbung

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

Die MGG-Färbung entspricht einer Standardfärbung für luftgetrocknete zytologische Präparate in der extragenitalen Zytologie, wie zum Beispiel Pleuraergüsse, Aszites, und Liquor. Das Prinzip der Färbung basiert auf einer Färbekombination zwischen der May-Grünwald und der Giemsa-Färbung. Auch hier erfolgt die Färbung nach einem standardisiertem Färbeprotokoll (Tab. 3) und resultiert in gut definierten Färbeergebnissen in den Zellkompartimenten (Tab. 4).

Färbeschritte	Inhalt der Küvetten	Inkubationszeit
1	Gebrauchsfertige MG-Lösung	5 Min
2	Gepuffertes Aqua dest.	1 Min
3	Gepuffertes Aqua dest.	1 Min
4	Gebrauchsfertige Giemsa-Lösung	15 Min
5	Gepuffertes Aqua dest.	1 Min
6	Gepuffertes Aqua dest.	1 Min

Tabelle 3: Zytologische MGG-Färbung gemäß interner SOP. MG = May-Grünwald

Zellkompartiment	Farbliche Darstellung
Kerne	blau-violett
Nukleolen	blau
Erythrozyten	rot
Zytoplasma	blau bis rosa
Schleim	rosa

Tabelle 4: Spezifische Färbeleistung der MGG-Färbung

## 2.2.4 PAS-Färbung

Mit Hilfe der PAS-Färbung lassen sich diverse Fragenstellungen beantworten. Mittels dieser Färbung lassen sich zum Beispiel Polysaccharide, Glykogen und Schleim nachweisen. Im Rahmen von Bronchiallavagen oder Mundhöhlenabstrichen bietet sich die Färbung an, um Pilze nachzuweisen. Außerdem kann mit ihr Sekret als Muzin-haltiger Schleim bei Adenokarzinomen identifiziert werden. Der standardisierte Ablauf der PAS-Färbereaktion erfolgt im Färbeautomaten und ist wie folgend dargestellt (Tabelle 5):

Färbeschritte	Inhalt der Küvetten	Inkubationszeit
1	96% Alkohol	5 Min
2	70% Ethanol	5 Min
3	50% Ethanol	5 Min
4	Aqua dest.	5 Min
5	Perjodsäure	5 Min
6	Aqua dest.	mehrmals spülen
7	Schiff's Reagenz	15 Min
8	SO <sub>2</sub> -Wasser	5 Min
9	Aqua dest.	kurz spülen
10	Aqua dest.	5 Min
11	Hämatoxylin nach Mayer	3 Min
12	Fließendes Leitungswasser	5 Min

Tabelle 5.: Zytologische PAS-Färbung gemäß interner SOP

## 2.2.5 Verarbeitung von nativen Körperhöhlen-Ergüssen

Voraussetzung für eine gute zellreiche Aufarbeitung seröser Ergüsse (Pleura- und Perikardergüsse, Aszites sowie Spülflüssigkeiten vom Douglasraum und aus dem Peritoneum) ist eine ausreichende Probenmenge von ca. 50 ml - 100ml. Das Material sollte nativ eingesandt werden. Klinischerseits sollte auf dem Begleitschein die Menge, die Farbe und die Konsistenz des Ergusses dokumentiert werden. Bei Be-

darf kann bei Vorhandensein von Gewebsanteilen in das Röhrchen 10%iges Formalin gegeben werden, um dann einen Zellblock anzufertigen und histologisch zu beurteilen.

### **Aufbereitungsprozess von Körperhöhlenergüssen nach institutsinterner SOP**

- Röhrchen 5 Min. bei 500 g zentrifugieren
- Objektträger mit Eingangsnummer des Instituts beschriften
- Nach Zentrifugation Überstand in ein zweites Röhrchen dekantieren
- Sediment aufschütteln
- Je 1 Tropfen (ca.20 µl) aufgeschütteltes Sediment mittels Pasteurpipette auf einen Objektträger geben und mit einem zweiten, flach auf den ersten Objektträger daran aufliegend, dünn ausstreichen.
- Objektträger lufttrockenen lassen und nach MGG färben.
- Letztlich die Objektträger nach dem Ausstreichen sofort und schnell in eine mit Delaunay-Fixativ gefüllte Küvette einstellen, 20-30 Min. fixieren lassen, dann nach Papanicolaou färben.

### **2.2.6 Verarbeitung von bronchialen Materialien**

Bei der Aufarbeitung von bronchialen Materialien, also Bronchialsekreten, Lavageflüssigkeiten sowie Kathetersaugbiopsien ist ebenfalls eine ausreichende Probenmenge die Voraussetzung für ein gut beurteilbares Ergebnis. Dabei können sich eine stärkere Blutbeimengung oder ein höherer Schleimgehalt präparatorisch negativ auswirken und die Aussagekraft der Proben herabsetzen (Pokieser et al. 2001). Der Aufbereitungsprozess wird im Folgenden dargestellt:

### **Aufbereitungsprozess von Bronchialsekreten, Lavageflüssigkeiten und Kathetersaugbiopsien nach institutsinterner SOP**

- Röhrchen mit Probe 5 Min. bei 500 g zentrifugieren.
- Objektträger mit Eingangsnummer des Instituts beschriften.
- 2 Objektträger sind für die Pap-Färbung, 1 Objektträger für die PAS-Färbung vorgesehen.

- Bei kaum sichtbarem Sediment wird ein Zytozentrifugat angefertigt.
- Nach der Zentrifugation mit einer Pasteurpipette durch den Überstand in das Sediment geben und das Sediment aufnehmen.
- Je 1 Tropfen (ca. 20 µl) Sediment auf zwei der vorbereiteten Objektträger geben, zweiten Objektträger flach auflegen und das Material durch Ausstreichen in verschiedene Richtungen gleichmäßig verteilen, zum Schluss in Längsrichtung ausstreichen.
- Objektträger gut trocknen lassen und in den dazu vorgesehenen Färbeständer klemmen.
- Objektträger nach Papanicolaou bzw. PAS färben.

### **2.2.7 Verarbeitung von Liquor**

Die Verarbeitung von entnommenem Liquor stellt eine Besonderheit dar. Da die Zellen im Liquor schnell autolysieren, bedarf es einer raschen Verarbeitung innerhalb maximal einer Stunde nach Entnahme. Die Einsendung erfolgt nativ in einem Glas oder Kunststoffröhrchen ohne Zusätze.

#### **Aufbereitungsprozess von Liquor nach institutsinterner SOP**

- Die Anzahl der notwendigen Objektträger ist abhängig von der eingesandten Liquormenge
- Pro Cytofunnel wird je 0,5 ml Liquor mit der Eppendorfpipette appliziert
- 10 Minuten zentrifugieren,
- das Sediment auf die Objektträger applizieren und in dem dafür vorgesehenen Färbeständer lufttrockenen lassen.
- Anschließend Färbung nach dem MGG-Färbeprotokoll (s. Kapitel 2.2.3).

### **2.2.8 Verarbeitung von Ausstrichpräparaten**

Feinnadelpunktate und per Abstrich gewonnene Präparate werden in Düsseldorf üblicherweise von den klinischen Ärzten bereits auf Objektträgern ausgestrichen

und je nach Organvorgabe luftgetrocknet oder mit alkoholischem Spray fixiert übersandt. Danach erfolgt dann im zytologischen Labor die Färbung der Objektträger mit der MGG-Färbung (luftgetrocknete Präparate, z.B. Schilddrüsenpunktate) bzw. der Papanicolaou-Färbung (alkoholfixierte Präparate, z.B. Pankreaspunktate).

## **2.3 Konventionelle zytologische Diagnostik**

Die mikroskopische Beurteilung der gefärbten Objektträger erfolgt durch ärztlich bzw. durch Zytologieassistent/-innen unter fachärztlicher Kontrolle, und zwar in der Regel mit dem Ziel, das vorhandene Zellmaterial auf das Vorliegen maligner Zellen zu untersuchen. Dazu wurden die gefärbten Präparate mit den in der Cytopathologie vorgehaltenen Lichtmikroskopen mäanderförmig vollständig mikroskopisch durchgemustert. Als Routinevergrößerung wurde mit einem 10x vergrößernden Objektiv gearbeitet. Im Bedarfsfall konnte höher vergrößert werden, da die Mikroskope auch über 20x-, 40x- und 63x-Objektive, letzteres unter Verwendung von Immersionsöl, verfügten.

### **2.3.1 Malignitätskriterien**

Die diagnostischen Kriterien sind in Lehrbüchern der Zytologie (z.B. Bubendorf et al. 2011, Koss und Melamed 2006) niedergelegt. Die Zuordnung von normalen, auf Malignität verdächtigen oder definitiv malignen Zellen orientiert sich in erster Linie an Veränderungen am Zellkern und am Chromatin ("Malignitätskriterien 1. Ordnung"). Dabei werden im Vergleich zu Normalgewebe bzw. normalen Zellen eine erhöhte Kerngröße, eine Entrundung der Kernform, eine erhöhte Kerngrößenvariabilität innerhalb einer Zellpopulation, eines zugunsten des Zellkerns verschobene Kern-Plasma-Relation sowie eine auffällige Struktur des Chromatins als Hinweise wichtige in Richtung Malignität gedeutet werden können. Ferner werden Nekrosen, bei Feinnadelpunktaten auch eine erhöhte Zelldispersion berücksichtigt. Daneben gibt es Hilfskriterien, die von Material zu Material unterschiedlich sein können.

Neben den Kernkriterien, den "Malignitätskriterien 1. Ordnung", gibt es noch weitere Kriterien, die eher als "Hilfskriterien (angesehen werden) und nicht unbedingt für die Diagnose einer malignen Neoplasie notwendig" sind (Bubendorf et al. 2011). Sie werden als Malignitätskriterien 2. und 3. Ordnung angesehen (Tabelle 6).

<b>Malignitätskriterien 1. Ordnung</b>	<b>Malignitätskriterien 2. Ordnung</b>	<b>Malignitätskriterien 3. Ordnung</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Struktur des Heterochromatins</li> <li>- Kernhintergrund</li> <li>- Kerngröße</li> <li>- Zu Gunsten des Zellkerns verschobene Kern-Plasma-Relation</li> <li>- Kerngrößenvariabilität (Anisokaryose)</li> <li>- Kernform</li> <li>- Kernmembran</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mehrkernigkeit</li> <li>- Nukleolenatypie</li> <li>- Verlust der Kohäsivität</li> <li>- Hyperchromasie des Zytoplasmas</li> <li>- Mitosen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Quetschempfindlichkeit</li> <li>- Ausstrichhintergrund</li> <li>- Zellkannibalismus</li> </ul>

Tabelle 6: Zytologische Malignitätskriterien modifiziert nach (Bubendorf et al. 2011)

In der mikroskopischen Diagnostik erfolgt dann eine detaillierte textliche Beschreibung der Zellbilder mit einer anschließenden Einordnung der Zellen nach vorliegender Malignitätswahrscheinlichkeit und schlussendlicher Formulierung einer Diagnose „unter Verwendung der bevorzugten Termini des ICD-0“ (Bubendorf et al. 2011). Ist das Zellbild eindeutig, so kann der Fall als abgeschlossen angesehen werden. Bei unklaren Zellbildern werden adjuvante Methoden (Immunzytochemie, DNA-Zytometrie, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder PCR-basierte molekulare Methoden) angeschlossen werden, um eine finale Einschätzung der suspekten Zellen zu ermöglichen.

Im Folgenden werden in einer Bildserie Beispiele zu „positiven“, „dringend verdächtigen“ und „zweifelhaften“ Befunden visualisiert (Abb. 5-7).

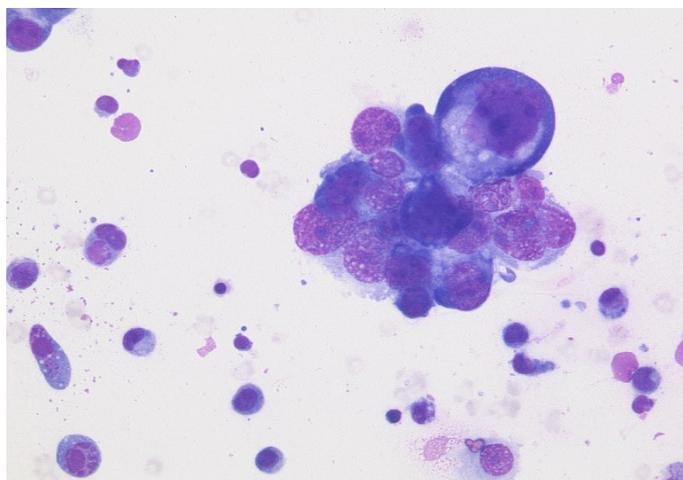


Abb. 5: MGG-gefärbtes Aszitespunktat, 40x Objektivvergrößerung

Darstellung von „positiven“ malignen Zellen mit Malignitätszeichen 1. Ordnung: Vergrößerte Chromatinstruktur, verschobene Kern-Plasma-Relation, Kerngrößenvariabilität, unregelmäßige Kernform.

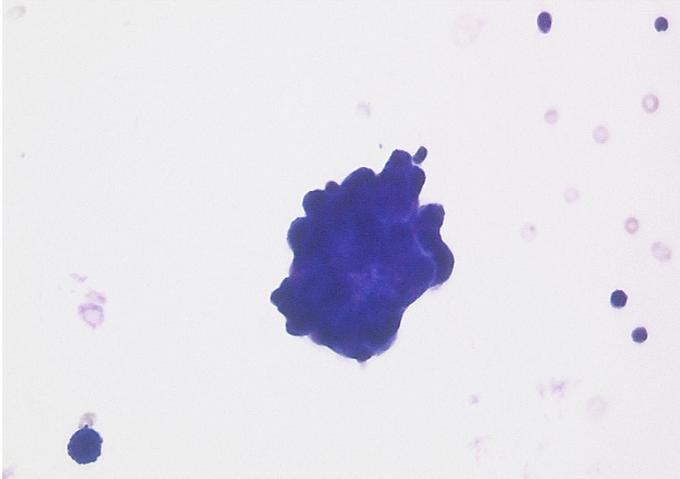


Abb. 6: MGG-gefärbtes Pleurapunktat, 40x Objektivvergrößerung

Darstellung von auf Malignität "dringend verdächtigen" Zellen: ein polyzyklischer, dreidimensionaler Zellverband mit zugunsten des Zellkerns verschobener Kern-Plasma-Relation

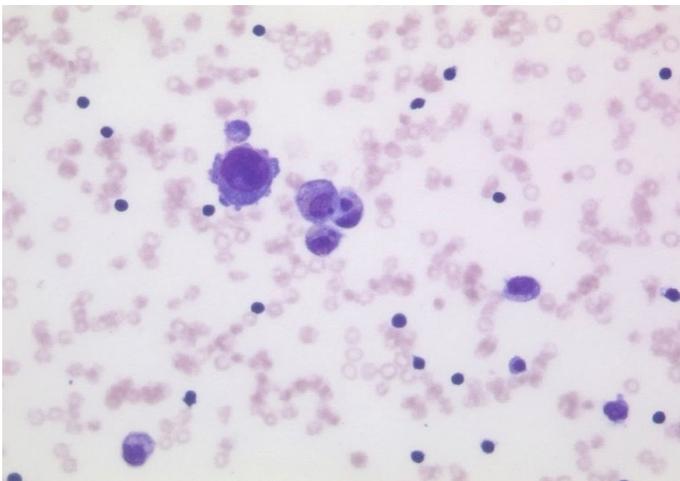


Abb. 7: MGG-gefärbtes Pleurapunktat, 20x Objektivvergrößerung

Darstellung von "zweifelhaften" Zellen: Kernpolymorphie, vergrößerte Chromatinstruktur, zugunsten des Zellkerns verschobene Kern-Plasma-Relation.

### 2.3.2 Erstellung der zytologischen Diagnose

Das Ziel der mikroskopischen Diagnostik ist neben der eigentlichen Diagnosestellung auch eine sinnvolle und vereinheitlichte kategoriale Darstellung der Malignitätswahrscheinlichkeit der Zellveränderungen.

Hierzu wurde von der *Arbeitsgemeinschaft Zytopathologie in der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP)* und der *Deutschen Gesellschaft für Zytologie (DGZ)* eine gemeinsame Nomenklatur verabredet (Böcking 1998), die in der Cytopathologie in Düsseldorf seitdem auch angewandt wird (Tabelle 7). Die dem jeweiligen zugehörige Kategorie wird dabei einem konkreten fallbezogenen Klartextbefund vorangestellt.

Kategorie	Interpretation
Unzureichend	technisch unzureichendes Material (z.B. zu wenig Zellen, schlecht erhaltene Zellen, nicht repräsentative Zellen in Bezug auf die Entnahmelokalisation)
Negativ	Tumorzellen nicht nachweisbar
Zweifelhaft	Tumorzellen nicht auszuschließen (wenige abnorme Zellen)
dringender Verdacht	Tumorzellen wahrscheinlich (aber bei morphologischen Restzweifeln nicht beweisbar)
Positiv	Tumorzellen sicher nachweisbar

Tabelle 7: Gemeinsame Nomenklatur der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Zytologie (DGZ) (Böcking 1998) für eine standardisierte und zugleich individualisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie

In Abbildung 8 ist ein typisch aufgebauter zytologischer Befund exemplarisch wiedergegeben.

Übersandt wurden 100 ml einer leicht rötlich tingierten klaren Flüssigkeit, klinisch 1,5 l umfassender Pleuraerguss bei bekanntem Mammakarzinom (NOS).

Mikroskopisch erkennt man neben Blut regelrecht aufgebaute Mesothelzellen und Makrophagen, ferner einige Lymphozyten und neutrophile Granulozyten. Außerdem kommen Verbände von atypischen Epithelzellen vor, überwiegend dreidimensional und sogenannten Morula-artig angeordnet. Die Zellen verfügen über unterschiedlich große, teils entrundete hyperchromatische Kerne mit vergrößertem Chromatin und Makronukleolen.

**Gutachten:**  
**Mit Nachweis bösartiger Tumorzellen (= positiv).** Das Zellbild entspricht einem mäßig differenzierten Adenokarzinom, von der Morphologie her gut passend zu einer Pleuraabsiedlung eines bekannten Mammakarzinoms.

Abb. 8: Textbeispiel eines typisch aufgebauten zytologischen Befundes in der Ergussdiagnostik

Für den Fall, dass ergänzende Untersuchungen (hier z.B. die Bestimmung der Hormonrezeptoren und von HER-2/neu) geplant sind, würden diese in einem Nachsatz angekündigt und später ein Nachtragsbericht erstellt.

### 2.3.3 Diagnostischer Algorithmus der konventionellen Befundung zytologischer Präparate

Das folgende Schema fasst den standardisierten Ablauf der Befundung extragenitaler zytologischer Präparate zusammen (Abb. 9):

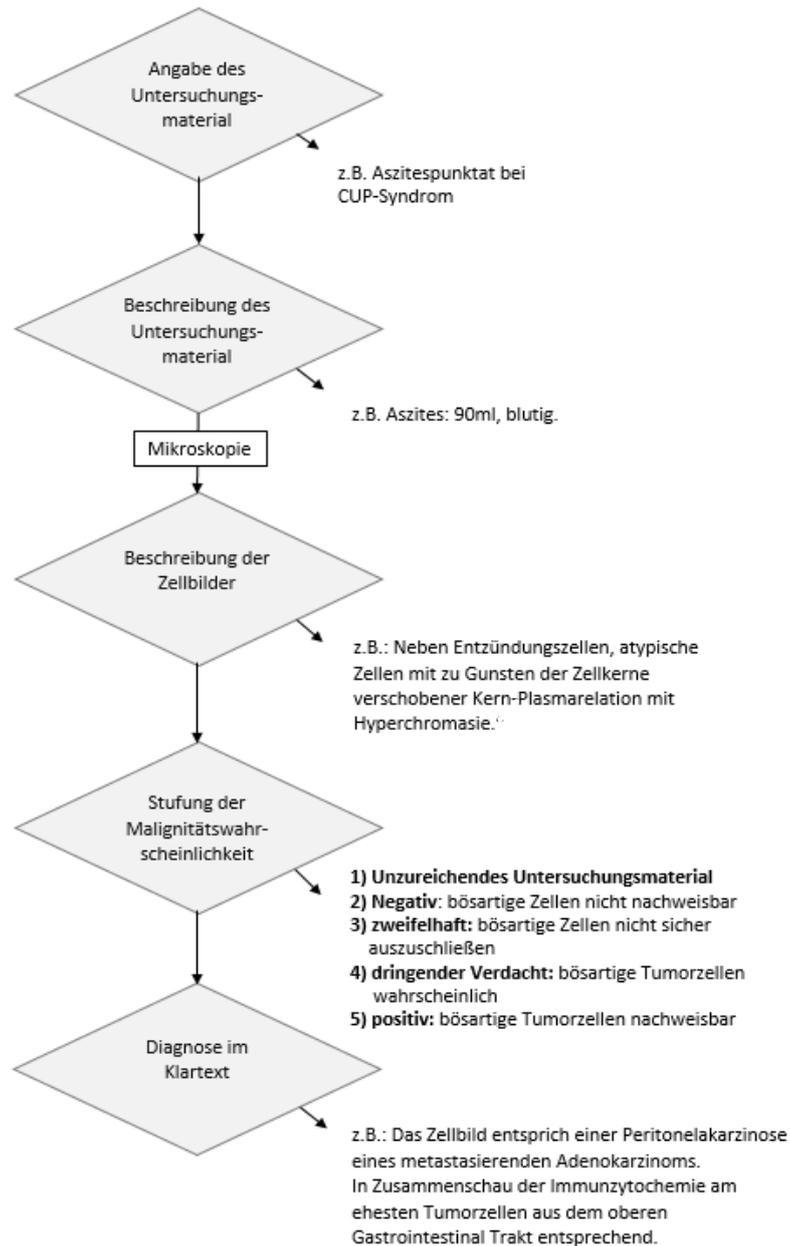


Abb. 9 Flussdiagramm zur Umsetzung der Nomenklatur der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Zytologie (DGZ) (Böcking 1998) in eine standardisierte und zugleich individualisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie

## **2.4 Adjuvante zytologische Diagnostik mittels Immunzytochemie**

### **2.4.1 Ablaufprozesse einer immunzytochemischen Färbung**

Das Prinzip der Färbung beruht auf der Darstellung Zielantigene durch spezifische Antikörper, welche mit der ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Peroxidase-Methode sichtbar gemacht werden. Die ABC-Methode basiert auf der hohen Affinität von Avidin für Biotin, wobei heutzutage Avidin zunehmend durch Streptavidin ersetzt wird, da so weniger Hintergrundfärbung entsteht. Durch diese hohe Affinität wird ein Enzym-Komplex gebunden und im Zuge dessen das Farbsubstrat umgesetzt (s. Kapitel 1.1.2). Die Spezifikation der Färbeleistung liegt in der rot-braunen Anfärbung des nachzuweisenden Antigens. Das Färbeergebnis der Membran-, Zytoplasma- und Kernantigene kann an den zytologischen Präparaten mikroskopisch beurteilt werden.

Der Prozess der immunzytochemischen Untersuchung erfolgte im Jahr 2009 noch manuell an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Inzwischen ist das Verfahren allerdings auf eine maschinelle Durchführung in Färbeautomaten umgestellt worden.

Am 1. Tag erfolgt bei dem manuellen Verfahren eine Vorbehandlung der Routineausstriche mit anschließendem Stoppen der endogenen Peroxidase und abschließender Inkubation der Primärantikörper in einer feuchten Kammer, wobei für die Kernantikörper (TTF-1, cdx-2, Ki-67 [MIB-1], ER, PR) nach der Vorbehandlung der Routineausstriche noch eine Hitzebehandlung zwischengeschaltet wird. Am 2. Tag wird zunächst ein Waschprozess durchgeführt, an den sich die Inkubation des Sekundärantikörpers und die Inkubation des Avidin-Biotin-Komplexes anschließen. Zur farblichen Darstellung erfolgen eine Substrat-Chromogen-Reaktion und eine Gegenfärbung mit Mayer Hämalaun, bevor das Präparat mit Aquatex eingedeckt wird. Umseitig sind die konkreten Abläufe kurz tabellarisch wiedergegeben (Tab. 8 und 9).

Für luftgetrocknete und Alkohol-fixierte Präparate sind die Vorgaben dabei weitestgehend gleich; bei Letzteren fällt der Schritt der Xyloinkubation zu Beginn weg. Sollen mehrere Antikörper auf dem gleichen Objektträger angewandt werden, dann kann mit einem sogenannten DAKO-Pen das Präparat in Zonen eingeteilt werden, auf die verschiedene Primärantikörper aufgebracht werden können.

## 1.Tag

### Vorbehandlung der Routineausstriche

Lösung	Inkubationszeit
Xylol	10 Min
Xylol	10 Min
Ethanol 100%	10 Min
Ethanol 100%	10 Min
Ethanol 96%	10 Min
Ethanol 96%	10 Min

### Hitzebehandlung für die Kernantikörper TTF-1, cdx-2, Ki67 (MIB-1), ER, PR

Lösung	Inkubationszeit
PBS-Puffer	5 Min
Citrat-Puffer ansetzen und in Colpinküvetten füllen	
OT (Colpinküvette) im Wasserbad	20 Min 80°C
OT in der Colpinküvette abkühlen lassen	20 Min
PBS-Puffer	5 Min

### Stoppen der endogenen Peroxidase

Lösung	Inkubationszeit
Blockierungslsg. (100ml Methanol + 1ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	30 Min
3x gut in PBS-Puffer spülen	
PBS-Puffer	10 Min
PBS-Puffer	10 Min

### Inkubation des Primärantikörpers (feuchte Kammer)

Lösung	Inkubationszeit
Normalserum (NS-Mouse für Mouse-AK, NS-Rabbit für Rabbit-AK)	29 Min
Flüssigkeit vom OT ablaufen lassen, nicht spülen	
Primär-AK, ca. 1ml auftragen Alternativ im Brutschrank	12-24 h

Tabelle 8: Arbeitsabläufe der immunzytochemischen Färbung gemäß SOP, 1. Tag

## 2. Tag

### Waschen

Lösung	Inkubationszeit
Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 Min
Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 Min

### Inkubation Sekundär-Antikörper

Lösung	Inkubationszeit
Biotinylierter-Sekundär-AK	30 Min
Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 Min
Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 Min

### Inkubation Avidin-Biotin-Complex

Lösung	Inkubationszeit
ABC-Elite Standard	30 Min
Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 Min
Tris 0,5M in PBS-Puffer 1:10	5 Min

### Substrat-Chromogen-Reaktion

Lösung	Inkubationszeit
AEC-Reagenz	40 Min
Aqua dest. steril	5 Min
Aqua dest. steril	5 Min

### Gegenfärbung

Lösung	Inkubationszeit
Mayer`Hämalaun	20-30 sec
Wässern unter fließendem Leitungswasser	10 Min

### Eindecken mit Aquatex

Lösung	Inkubationszeit
OT mit Aquatex eindecken	

Tabelle 9: Arbeitsabläufe der immunzytochemischen Färbung gemäß SOP, 2. Tag

## 2.4.2 Übersicht der verwendeten Primärantikörper

Abhängig von dem eingesandten Material und der Menge sowie unter Berücksichtigung von zusätzlichen klinischen Angaben und dem Ergebnis der konventionellen zytologischen Diagnostik wurden zu Konkretisierung der jeweiligen Diagnose verschiedene immunzytochemische Marker eingesetzt.

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Antikörper werden in Tabelle 10 alphabetisch wiedergegeben. Sie wurden von verschiedenen Herstellern bezogen und gemäß den in den SOP dargelegten, auf Erfahrungen im Institut basierenden Verdünnungen angewandt.

<b>Antikörpername + Lokalisation des Färbeergebnis</b>	<b>Typischerweise positive Tumoren</b>
<b><math>\alpha</math>1-Antitrypsin</b> (AAT-1) - zytoplasmatisch	Hepatozelluläres Karzinom (HCC)
<b>Anti-Myo-D1</b> - nukleär	Myogene Läsionen z.B. Rhabdomyosarkom
<b><math>\alpha</math>-Aktin</b> (Smooth Muscle Actin; SMA) - zytoplasmatisch	Glattmuskulär differenzierte Tumore z.B. Leiomyom, Leiomyosarkom
<b>AFP</b> (Alpha-Fetoprotein) - zytoplasmatisch	HCC, Dottersacktumore (nicht spezifisch), Hepatoblastome
<b>BerEP4</b> - membranär	DD z.B. Adenokarzinom (+) und Mesotheliom (-) (negativ in Plattenepithel und Mesothel)

Tabelle 10 (Anfang): Alphabetisch geordnete Liste der verwendeten Antikörper

<b>Antikörpername + Lokalisation des Färbeergebnisses</b>	<b>Typischerweise positive Tumoren</b>
<p><b>Bcl-2</b> (B cell lymphoma-2) - membranär, zytoplasmatisch</p>	Folikuläres Lymphom, Synovialsarkom, zum Teil in CD34 + Tumoren (GIST)
<p><b>Bcl-6</b> (B cell lymphoma-6) - nukleär</p>	Lymphome follikulären Ursprungs
<p><b>Calretinin</b> - zytoplasmatisch, nukleär</p>	Maligne Mesotheliome (DD zu Karzinomen (-))
<p><b>CA125</b> - luminal</p>	Ovariakarzinom (Serummarker zum Monitoring des Ovariakarzinoms; nicht spezifisch)
<p><b>cdx-2</b> (intestinal-spezifischer Transkriptionsfaktor; Homebox- Gen) - nukleär</p>	Intestinale Karzinome (variable / fokale Expression in Karzinomen des Magen oder des pankreatikobiliären Systems)
<p><b>CD1a</b> - membranär</p>	Langerhanszell-Histiozytose
<p><b>CD 15</b> - membranär</p>	Adenokarzinome (+) vs. Mesotheliom (-), Reed-Sternbergzellen (+) in Hodgkin-Lymphomen
<p><b>CD20</b> B-Zell-Antikörper - zytoplasmatisch</p>	B-Zell-Marker

Tabelle 10 (Fortsetzung): Alphabetisch geordnete Liste der verwendeten Antikörper

<b>Antikörpername + Lokalisation des Färbergebnisses</b>	<b>Typischerweise positive Tumoren</b>
<b>CD 30</b> (Ki-1)  - membranär	Reed-Sternbergzellen im klassischen Hodgkin-Lymphom, Embryonales Karzinom
<b>CD 31</b>  - zytoplasmatisch, membranär	Endothelial differenzierte Tumore/ Karzinome (spezifischer und sensitiver als CD34), Angiosarkom, Kaposi-Sarkom
<b>CD 34</b>  - zytoplasmatisch, membranär	Markiert endotheliale Zellen, damit fast alle vaskulären Neubildungen. (+) in diverse Weichteiltumoren (z.B. Angiosarkom, GIST, MPNST)
<b>CD45-Ro</b>  - zytoplasmatisch, membranär	Pan-Leukozytenmarker, (+) in vielen hämatopoetischen Neoplasien (z.B. T- und B-ALL)
<b>CD56</b>  - membranär	Neuroendokrine Tumore der Lunge, T-Zell-Lymphome,
<b>CD 68</b>  - zytoplasmatisch, membranär	Lysosomaler Marker in Histiozyten, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten. AML mit monozytärer Differenzierung
<b>CD 79a</b>  - zytoplasmatisch	B-Zell-Neoplasien, B-ALL, Plasmazell-Myelome

Tabelle 10 (Fortsetzung): Alphabetisch geordnete Liste der verwendeten Antikörper

<b>Antikörpername + Lokalisation des Färbeergebnisses</b>	<b>Typischerweise positive Tumoren</b>
<b>CD 99</b> (MIC2, O13) - membranär (spezifischer), zytoplasmatisch	Ewing Sarkom (nicht spezifisch) B- und T-Zell-lymphoblastische Leukämie
<b>CD117(c-kit)</b> Stammzellrezeptor-Faktor - zytoplasmatisch, membranär	Gastrointestinale Stromatumore
<b>CD138</b> - membranär	Plasmazelldifferenzierte Tumore, Multiples Myelom
<b>CD146 (Mel-CAM)</b> - membranär	Chorionkarzinom, Malignes Melanom. Theoretisch zur Differenzierung von Malignen Mesotheliomen (+) vs. reaktiven mesothelialen Proliferationen (-)
<b>CD168</b> - zytoplasmatisch, nukleär	Expression in diversen Tumoren (Mamma, Magen, kolorektales Karzinom, Prostata, multiples Myelom (Überexpression assoziiert mit hohem Metastasierungspotential und fortschreitendem Krebswachstum))
<b>CEA</b> (Carcino-embryonales Antigen) - zytoplasmatisch	Adeno-Ca (+) (z.B. des Dickdarms, des Pankreas, der Lunge) versus Mesotheliome (-)
<b>Chromogranin A</b> - zytoplasmatisch, granulär	Tumor mit neuroendokriner Differenzierung (z.B. Phäochromozytome, Neuroendokrine Tumore)
<b>CK1/CK10/CK11</b> - zytoplasmatisch, membranär	Mix zur epithelialen Differenzierung (viele Karzinome vor allem Plattenepithelkarzinome)

Tabelle 10 (Fortsetzung): Alphabetisch geordnete Liste der verwendeten Antikörper

<b>Antikörpername + Lokalisation des Färbeargebnisses</b>	<b>Typischerweise positive Tumoren</b>
<b>CK5/6</b> - zytoplasmatisch	Plattenepithelkarzinome (+), Mesotheliome (+), Adenokarzinome (-)
<b>CK7</b> - zytoplasmatisch	Große Mehrzahl der nicht-intestinalen Adenokarzinome
<b>CK8</b> - zytoplasmatisch, nukleär	Nicht-plattenepithelial differenzierte Karzinome, (z.B. HCC, Nierenzellkarzinom, viele glandulär differenzierte Karzinome)
<b>CK20</b> - zytoplasmatisch	spricht im Gesamtkontext für unterhalb des Diaphragmas lokalisierte Karzinome (insbesondere kolorektale Karzinome), Merkelzellkarzinom
<b>Desmin</b> - zytoplasmatisch	Glatt- und quergestreift-muskuläre Tumore (Rhabdomyosarkom). Reaktive mesotheliale Zellen (+) vs. Mesotheliom (-)
<b>EMA</b> - zytoplasmatisch, membranär	Generell Karzinome, sowie Synovialsarkom, Chordom
<b>Gastrin</b> - zytoplasmatisch	Gastrin produzierende neuroendokrine Tumoren

Tabelle 10 (Fortsetzung): Alphabetisch geordnete Liste der verwendeten Antikörper

<b>Antikörpername + Lokalisation des Färbeergebnisses</b>	<b>Typischerweise positive Tumoren</b>
<p><b>GFAP</b> (Glial Fibrillary Astrocytic Protein)</p> <p>- zytoplasmatisch</p>	Gliome (Astrozytom)
<p><b>Anti-Glukagon</b></p> <p>- membranär</p>	Glukagonome
<p><b>HEA125</b> (Ep-CAM)</p> <p>- zytoplasmatisch</p>	Große Mehrzahl der Karzinome (differenziert epitheliale und mesenchymale Zellen, reagiert nicht mit Mesothelzellen)
<p><b>HepPar-1</b> (Hepatocyte Paraffin 1; OCH1EE5)</p> <p>- granulär zytoplasmatisch</p>	Hepatozelluläres Karzinom (HCC)
<p><b>Her2-neu</b> (human epidermal growth factor receptor 2)</p> <p>- membranär</p>	Wichtige Bedeutung in der Behandlung und Diagnostik von Mamma- und Magenkarzinomen
<p><b>HMB-45</b></p> <p>- zytoplasmatisch</p>	Nävi und melanozytäre Tumore (z.B. malignes Melanom)
<p><b>IgG</b></p> <p>- zytoplasmatisch</p>	Plasmazellen (+), Relevanz im Spektrum entzündlicher und sklerosierender Erkrankungen (z.B. Autoimmunpankreatitis)

Tabelle 10 (Fortsetzung): Alphabetisch geordnete Liste der verwendeten Antikörper

<b>Antikörpername + Lokalisation des Färbeergebnisses</b>	<b>Typischerweise positive Tumoren</b>
<b>Insulin</b> - zytoplasmatisch, membranär, granulär	Neuroendokrin differenzierte Tumore (Insulinom)
<b>Ki67</b> (MIB-1) - nukleär	Proliferationsmarker
<b>LCA</b> (Leucocyte Common Antigen; CD45) - zytoplasmatisch, membranär	Hämatopoetische Neoplasien, (Leukämie vom B- und T-Zell-Typ, NHL)
<b>Mammaglobin</b> - zytoplasmatisch	Mammakarzinom
<b>Melan A</b> (Melan A Antikörper) - zytoplasmatisch	Nävi und melanozytäre Tumore (z.B. malignes Melanom)
<b>Napsin A</b> (Napsin a Aspartic Peptidase [NAPSA] Antikörper) - zytoplasmatisch, granulär	Adenokarzinome der Lunge, Nierenzellkarzinome
<b>Östrogen-Rezeptor</b> - nukleär	Mammakarzinom

Tabelle 10 (Fortsetzung): Alphabetisch geordnete Liste der verwendeten Antikörper

<b>Antikörpername + Lokalisation des Färbeergebnisses</b>	<b>Typischerweise positive Tumoren</b>
<p><b>PSA</b> (Prostatic Specific Antigen)</p> <p>- zytoplasmatisch</p>	Prostatakarzinom
<p><b>PSMA</b> (Prostatic Specific Membrane Antigen)</p> <p>- Zytoplasmatisch, membranär</p>	Prostatakarzinom
<p><b>p40</b> (Interleukin 12b Antikörper)</p> <p>- nukleär</p>	Plattenepithelkarzinome
<p><b>Progesteron-Rezeptor</b></p> <p>- nukleär</p>	Mammakarzinom
<p><b>p63</b> (Tumor Protein p63 Antikörper)</p> <p>- nukleär</p>	Plattenepithelkarzinome
<p><b>P504S/Racemase</b> (AMACR)</p> <p>- zytoplasmatisch</p>	Prostatakarzinom (nicht spezifisch)
<p><b>RCC</b> (renal cell carcinoma; Regulator of Chromosome Condensation)</p> <p>- zytoplasmatisch</p>	Nierenzellkarzinome (nicht spezifisch)

Tabelle 10 (Fortsetzung): Alphabetisch geordnete Liste der verwendeten Antikörper

<b>Antikörpername + Lokalisation des Färbeergebnisses</b>	<b>Typischerweise positive Tumoren</b>
<b>Serotonin</b> - nukleär	Tumore mit neuroendokriner Differenzierung und Hormonproduktion
<b>Synaptophysin</b> - zytoplasmatisch	Tumore mit neuroendokriner Differenzierung
<b>S-100</b> - nukleär, zytoplasmatisch	Nävi und melanozytäre Tumore (z.B. malignes Melanom), neurogene Tumoren
<b>Thyreoglobulin</b> - zytoplasmatisch	Karzinome der Schilddrüse (follikulären Ursprungs)
<b>TTF-1</b> (Thyroid Transkription Faktor 1) - nukleär	Schilddrüsenkarzinome, Adenokarzinome der Lunge
<b>Uroplakin</b> - zytoplasmatisch	Urothelkarzinome
<b>Vimentin</b> - zytoplasmatisch	Tumoren mit mesenchymaler Differenzierung
<b>WT-1</b> (Wilms Tumor 1) - nukleär	Wilmstumor, Mesotheliom, seröse Ovarialkarzinome

Tabelle 10 (Ende): Alphabetisch geordnete Liste der verwendeten Antikörper

### **2.4.3 Algorithmen zur Anwendung immunzytochemischer Reaktionen: Markerpanels**

Bei der Fülle der zur Verfügung stehenden Marker ist es sinnvoll, bestimmte Markerkombinationen für bestimmte Fragestellungen vorzusehen.

Die Auswahl einzelner oder kombinierter Antikörper im Rahmen einer ergänzenden adjunktiven Untersuchung ist dabei abhängig von folgenden mikroskopischen Befunden:

- Ist das zytologische Bild zweifelhaft oder dringend verdächtig auf Tumorzellen, so kommt ein Markerpanel zur Tumoridentifikation zum Einsatz.
- Zeigt das zytologische Bild bereits eindeutig maligne Zellen, so wird auch unter Berücksichtigung der klinischen Angaben ein Markerpanel zur Tumortypisierung genutzt.
- Letztlich existieren auch Fälle, welche eine Sonderstellung insofern einnehmen, als dass zum einen nur wenig Material für eine ergänzende immunzytochemische Untersuchung vorliegt und somit einzelne Antikörper gezielt ausgewählt werden müssen oder seitens der Klinik bestimmte spezielle Untersuchungen - zum Beispiel eine therapierelevante Bestimmung des Hormonrezeptorstatus und / oder des Her2-neu-Rezeptors gewünscht sind.
- Eine weitere Sonderstellung nehmen Fragestellungen zu malignen Mesotheliomen sowie Lymphomen ein.

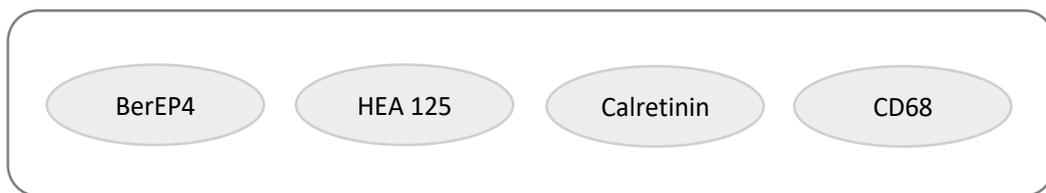
Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Studie das Patientenkollektiv hinsichtlich der Indikation für eine immunzytochemische Untersuchung in folgende Kategorien verteilt:

- Tumoridentifikation
- Tumortypisierung
- Sonderfälle

Im Folgenden werden kurz zwei Anwendungsbeispiele von Markerpanels vorgestellt.

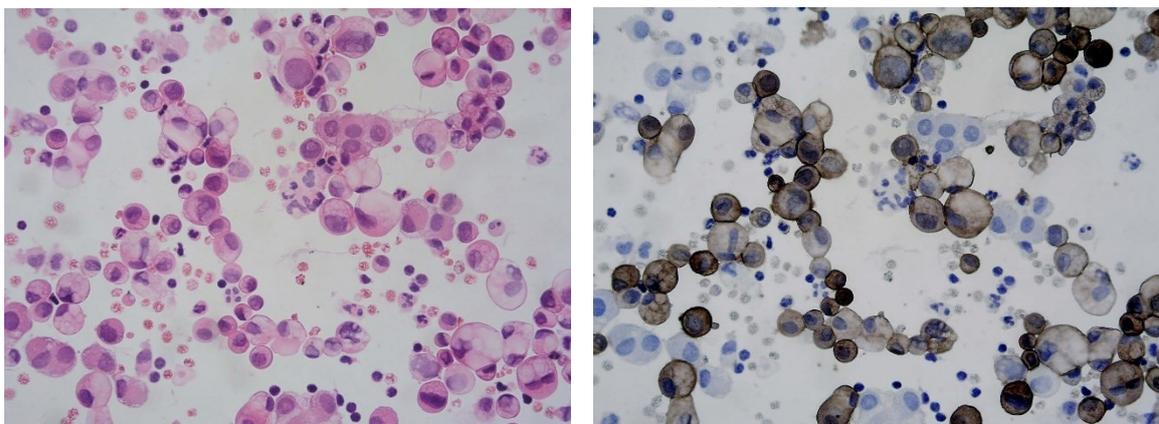
### 2.4.3.1 Immunzytochemische Marker im Fall der Tumoridentifikation

Finden sich beispielsweise in einem Pleuraerguss mit florider Entzündung Zellkomplexe mit Verdacht auf Tumorzellen, so bieten sich Antikörper wie BerEP4 und HEA125 an, welche epitheliale Zellen identifizieren, da diese normalerweise in einem Erguss nicht zu finden sein sollten. Als Gegenprobe können Mesothelien mit Calretinin oder Makrophagen mit CD68 markiert werden (Abb. 10).



**Abb. 10:** Immunzytochemisches Markerpanel aus der Cytopathologie zur Anwendung und Abklärung von verdächtigen und zweifelhaften Befunden in Körperhöhlenergüssen. Üblicherweise markieren BerEP4 und HEA125 epitheliale Zellen, Calretinin mesotheliale Zellen und CD68 Histiozyten und Makrophagen

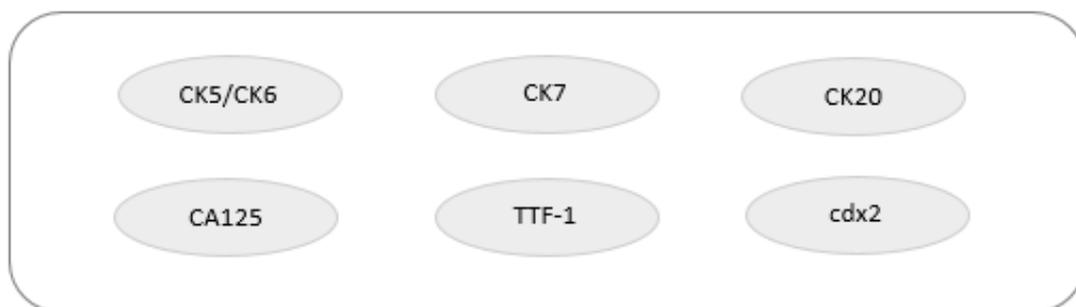
Abbildung 11 zeigt einen Aszites, der in der Routinefärbung suspekte einzeln liegende Zellen aufwies; in der HEA125-Immunzytochemie ließen sich viele von ihnen als Tumorzellen eines Adenokarzinoms identifizieren. In der späteren Tumortypisierung erfolgte die Zuordnung zu einer Peritonealkarzinose eines gering differenzier-ten serösen Ovarialkarzinoms.



**Abb. 11:** Darstellung verdächtiger Zellen in einem Aszites in einer Routinefärbung (links) und Identifizierung als epitheliale Tumorzellen durch an der Zellmembran betonte HEA125-Positivität in der Immunzytochemie (rechts) (Biesterfeld 2015)

### 2.4.3.2 Immunzytochemische Marker im Fall der Tumortypisierung

Auf der anderen Seite bietet der Einsatz diverser immunzytochemischer Marker die Möglichkeit, Tumorzellen konkret zu typisieren. Insbesondere an konventionell zytologisch „tumorzell-positiv“ diagnostizierten Fällen gelingt eine nähere Typisierung mit bereits etablierten Markerpanels. Ein häufig am Institut für Zytopathologie verwendetes Markerpanel, vor allem bei CUP-Syndromen, ist in Abbildung 12 dargestellt. Es repräsentiert eine geeignete Kombination zur differentialdiagnostischen Abklärung diverser Malignome. CK5/7, CK7 und CK20 sind differentielle Zytokeratine und dienen zur Abgrenzung zwischen Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen. Die semiquantitativ-vergleichende Beurteilung der Färbergebnisse von CK7 und CK20 kann bereits Hinweise auf die Lokalisation von Adenokarzinomen geben, die dann durch Marker wie CA125, TTF-1 und cdx-2 in Richtung Ovarialkarzinom, Adenokarzinom der Lunge oder Adenokarzinom des Gastrointestinaltraktes verdichtet werden können. Die vorliegende Studie zeigt in dem Ergebnisteil, dass in vielen Fällen mit Hilfe des oben dargestellten Markerpanels eine abschließende Tumortypisierung möglich war.



**Abb. 12:** Immunzytochemisches Markerpanel aus der Cytopathologie zur Typisierung maligner epithelialer Tumorzellen. CK5/6 markiert überwiegend Plattenepithelkarzinome, CK7 und CK20 verschiedene Arten von Adenokarzinomen, CA125 Ovarialkarzinome, TTF-1 Adenokarzinome der Lunge und cdx-2 Karzinome des Gastrointestinaltraktes, Stand 2015 (Biesterfeld 2015). Vereinfachte Darstellung des Algorithmus aus Abb. 5 (siehe dort)

In Abbildung 13 ist exemplarisch gezeigt, wie sich ein CK7-positives und ein CK20-negatives Adenokarzinom in einem Pleuraerguss weiter typisieren ließ.

Die Reaktion mit TTF-1 war spezifisch positiv, diejenigen mit CA125 und cdx-2 und GATA-3 waren negativ, so dass offenbar ein primäres pulmonales Adenokarzinom vorlag (Stadium pM1a).

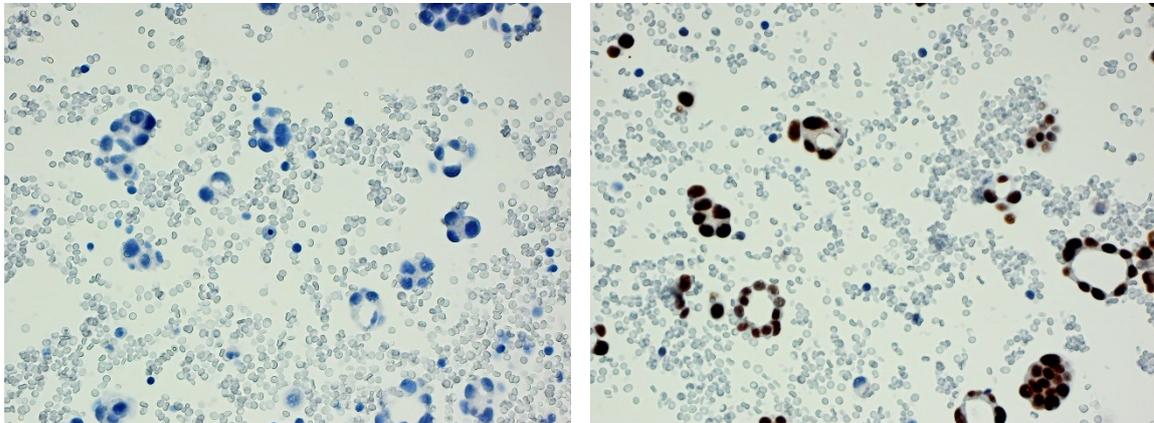


Abb. 13: Identifizierung von Tumorzellen eines Adenokarzinoms in einem Pleuraerguss in einer Routinefärbung (links) und Zuordnung zu einem primären pulmonalen Adenokarzinom durch nukleäre TTF-1-Positivität in der Immunzytochemie (rechts) (Biesterfeld 2015)

### **2.4.3.3 Immunzytochemische Marker bei Sonderfällen**

Durch den standardisierten Einsatz von Markerpanels zur Tumorsuche und Tumortypisierung lassen sich zwar eine große Anzahl von Fällen abschließend klären. Allerdings finden sich immer wieder auch Fälle, die eine Sonderstellung einnehmen und individuell, das heißt in Anlehnung an die klinische Fragestellung und in Abhängigkeit von dem zur Verfügung stehenden Material, beurteilt werden mussten. Somit werde im Ergebnisteil auch Fälle präsentiert, welche nicht durch die Anwendung von Standardpanels näher untersucht werden können, sondern unter Einsatz von individuell ausgewählten Antikörpern typisiert werden. Die Kategorien, die diese Sonderstellung einnehmen betreffen insbesondere die Diagnostik von malignen Mesotheliomen und malignen Lymphomen sowie die Analyse der Hormonrezeptoren bei Mammakarzinomen.

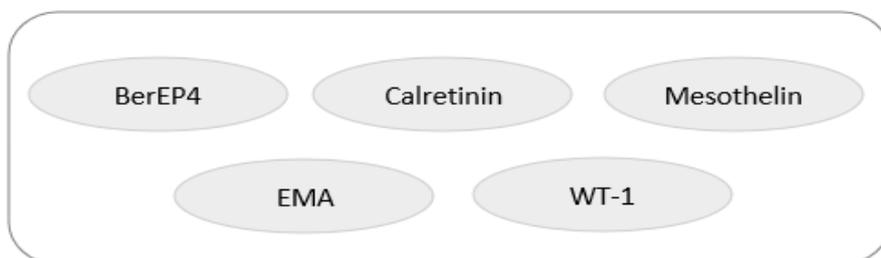
Das Markerpanel, bzw. die Auswahl der Antikörper, welches insbesondere bei der Fragestellung bzgl. maligner lymphoproliferativer Erkrankungen angewendet wird gestaltet sich wie folgt (Abb. 14):



**Abb. 14:** Immunzytochemisches Markerpanel aus der Cytopathologie zur Typisierung maligner Lymphoproliferativer Erkrankungen, Stand 2015 (Biesterfeld 2015)

Während LCA als global orientierender Marker für Lymphozyten und Plasmazellpopulationen eingesetzt wird, markieren CD20 und CD79a B-Lymphozyten und CD45RO T-Lymphozyten. CD15 und CD30 erlaubt immunzytochemisch eine nähere Einordnung bei der Frage zu Hodgkin-Lymphomen. CD138, ein Plasmazellmarker findet den Einsatz bei der Frage zu plasmazellulären Erkrankungen. BCL2 und BCL6 findet unter anderem z.B. Anwendung bei der Frage zu follikulären Lymphomen. Letztlich gelingt eine nähere Einschätzung zur proliferativen Aktivität über den Einsatz des Antikörpers Ki67. Die genannten Marker finden selten als ganzes Panel Anwendung. In Abhängigkeit von der Klinik, der konventionellen zytologischen Einschätzung und in Abhängigkeit vom ausreichend vorhandenem Zellmaterial werden sie sehr individuell kombiniert.

Bei der Diagnostik bzw. differentialdiagnostischen Abklärung von malignen Mesotheliomen, bieten sich folgenden Antikörper an (s. Abb. 15):



**Abb. 15:** Algorithmus aus dem Funktionsbereich Cytopathologie für die Anwendung und Interpretation immunzytochemischer Marker zur Unterscheidung einer epithelialen von einer mesothelialen Zellpopulation, Stand 2015 (Biesterfeld 2015); inzwischen wird Mesothelin nicht mehr verwendet

Grundsätzlich werden für die Diagnostik eines malignen Mesothelioms mindestens 2 Antikörper, welche Mesothelien markieren benötigt. Hierzu zählen Calretinin, Mesothelin und WT-1. Zur differentialdiagnostischen Abklärung werden ebenfalls mindestens 2 epitheliale Marker wie z.B. BerEP4 und EMA benötigt.

Für die Fälle, im Speziellen in der Kategorie der Mammakarzinome, findet neben dem Einsatz von Mammaglobin, ein Antikörper-Panel Anwendung das aus den Hormon-Rezeptoren Östrogen und Progesteron sowie dem Her-2-Neu-Rezeptor besteht (Abb. 16). Ergänzt wird dieses Panel heute um den Proliferationsmarker Ki-67.

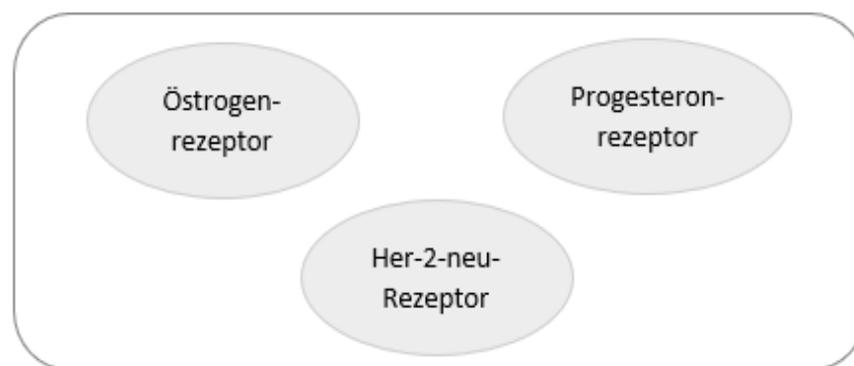


Abb. 16: Immunzytochemisches Markerpanel aus der Cytopathologie zur Hormonrezeptor-Analyse, Stand 2015 (Biesterfeld 2015)

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Kategorisierung der Fälle in Untergruppen**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte deskriptiv mittels der Excel-Diagramm- und Tabellenkalkulation und gliedert sich in folgende Arbeitsschritte:

1) Das Gesamtkollektiv wurde zunächst in diverse Kategorien, dem Untersuchungsmaterial zugrunde liegend, unterteilt und nach Geschlecht (m=männlich, w=weiblich) sortiert. Somit ergeben sich insgesamt 9 Kategorien wie folgt:

- Pleurapunktat (PP)
- Perikardpunktat (PE)
- Feinnadelpunkt (FNP)
- Aszitespunktat (AP)
- Douglaspunktat (DP)
- Bronchoalveoläre Lavage / Bronchialbürstenabstrich (BAL)
- Liquorpunktat (LP)
- Mundschleimhautabstrich (MS)
- Bindehautabstrich (BA)

2) Unter Berücksichtigung der digital detektierbaren klinischen Angaben wurden innerhalb der neun Kategorien folgende Aspekte berücksichtigt:

- Tumor vorbekannt?
- Tumor nicht vorbekannt (und nicht vermutet)?
- klinischerseits Tumorverdacht?

3) In Anlehnung des in dieser Studie zugrundeliegenden zentralen Themas - Indikation und Durchführung der Immunzytochemie - wurde im nächsten Schritt unter Berücksichtigung des Mikroskopieergebnisses (Tumorzellen positiv, dringend verdächtig, zweifelhaft, negativ) die jeweilige Kohorte innerhalb der 9 Kategorien nach dem folgenden Schema subkategorisiert:

- Indikation Tumoridentifikation:

Hierbei wurde hauptsächlich das Markerpanel BerEP4 und HEA125 bei mikroskopisch zweifelhaften und dringend verdächtigen Fällen eingesetzt, da es im Wesentlichen um epitheliale Malignome, seltener um nicht-epitheliale Malignome ging. Dennoch gibt es Fälle, bei denen nur einzelne oder ergänzende Marker eingesetzt wurden.

- Indikation Tumortypisierung:

Bei mikroskopisch sichtbaren Tumorzellen und dem Ziel der Identifikation des Primärtumors kamen in dieser Kategorie für beide Geschlechter vorwiegend die Marker CK5/6, CK7, CK20, cdx2, TTF-1 und bei Frauen ergänzend CA125 als Panelanwendung zum Einsatz. Zum Teil wurden jedoch auch hier nur einzelne oder ergänzende Marker genutzt.

- Sonderfälle:

Die Sonderfälle umfassen die folgenden Subkategorien:

- Malignes Mesotheliom
- Lymphom
- Hormonrezeptoranalyse
- diverse Einzelfälle (s. separat in den jeweiligen Kapiteln) bei denen jeweils individuelle Antikörper(-panel) Anwendung fanden; wie in Kapitel 2.4.3.3 beschrieben.

4) Anschließend erfolgte die Auflistung der eingesetzten Antikörper/Antikörperpanels, insbesondere bei den individuellen bzw. Sonderfällen und die Bewertung der immunzytochemischen Ergebnisse.

5) In einem letzten Schritt wurden die mit Hilfe der Immunzytochemie detektierten Diagnosen nach Organen sortiert.

Im Folgenden wird zunächst ein statistischer Gesamtüberblick aller Daten dargestellt. Anschließend erfolgt die detaillierte statistisch-deskriptive Auswertung in den jeweiligen Kategorien und Subkategorien, bevor ein Résumé den Abschluss bildet. Dabei wurde in jeder Kategorie eine individuelle und keine vereinheitlichende Auswertung der Daten vorgenommen.

Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da sich zum einen das Tumorspektrum unterscheidet und zum anderen, um einen besseren Überblick bei der Betrachtung der Ergebnisse in den jeweiligen Kategorien, die sich auch in der Anzahl unterscheiden, zu ermöglichen.

### 3.2 Aufarbeitung des Patientenkollektivs

Im Jahr 2009 betrug am Institut für Cytopathologie der Uniklinik in Düsseldorf die Gesamtzahl der eingesandten Fälle  $n = 13670$ , ausschließlich bezogen auf extragynäkologische Fälle, also ohne Gyn-Abstriche. Von den 13670 Fällen wurden über die Software dc-Pathos Systems 376 Patienten identifiziert (2,8%), bei denen für eine konkrete Diagnosestellung bei ausreichendem Material die Immunzytochemie ergänzend zur Morphologie zum Einsatz gekommen ist (Abb. 17).

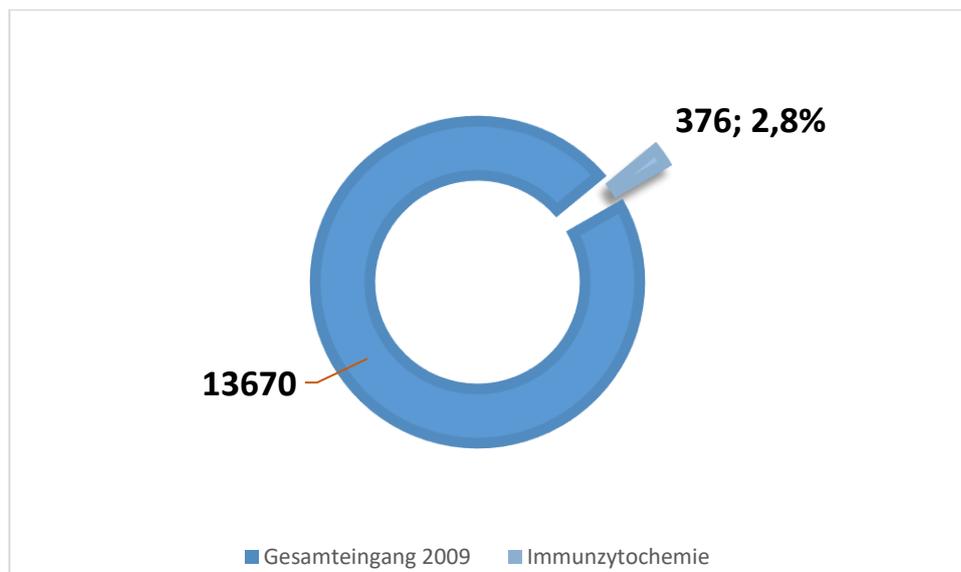
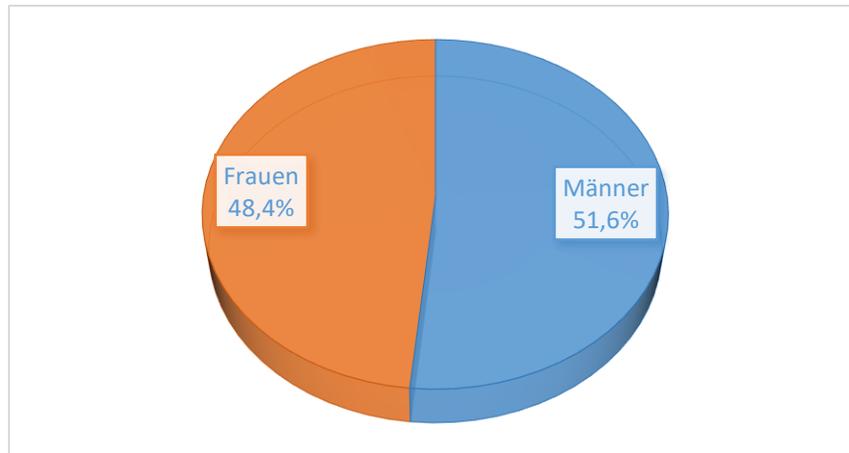


Abb. 17: Überblick Gesamteingang der eingesandten extragynäkologischen Fälle für das Jahr 2009 in Relation zu der Anzahl der durchgeführten Immunzytochemie

In 375 untersuchten Fällen wurde die immunzytochemische Labortechnik eigens im Institut durchgeführt. Bei einem Fall handelte es sich um die Bitte einer Zweitmeinung. Hierzu wurden acht bereits konventionell und immunzytochemisch gefärbte Präparate eingesandt und konsiliarisch beurteilt.

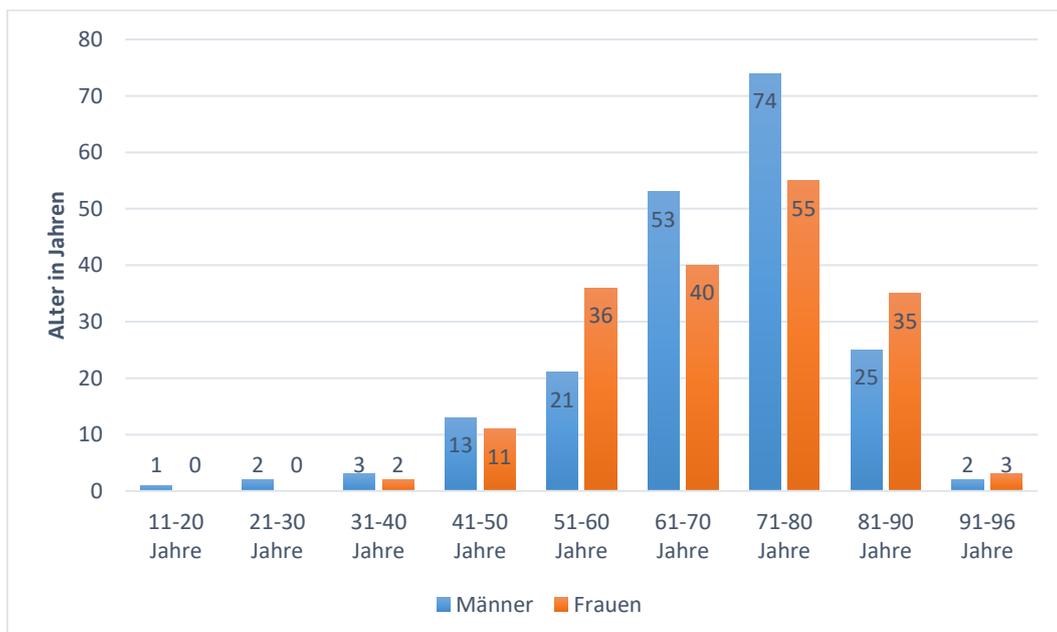
### 3.3 Geschlechtsverteilung und Altersverteilung

Bei den insgesamt 376 Patienten handelt es sich um 194 (51,6%) Männer und 182 (48,4%) Frauen (Abb. 18).



**Abb.18:** Prozentuale Verteilung der untersuchten Kohorte (n=376) nach Geschlecht der Patienten

Das Alter der Patienten reichte von 11-96 Jahren, wobei der Altersgipfel für beide Geschlechter bei 71-80 Jahren lag (n = 129; 34%). Eine detaillierte Altersverteilung zeigt Abbildung 19.



**Abb. 19:** Altersverteilung aller Patienten (n=376) sortiert nach Geschlecht

Das durchschnittliche Alter lag bei Männern bei 69 Jahren und bei Frauen bei 70 Jahren (Abb. 20).

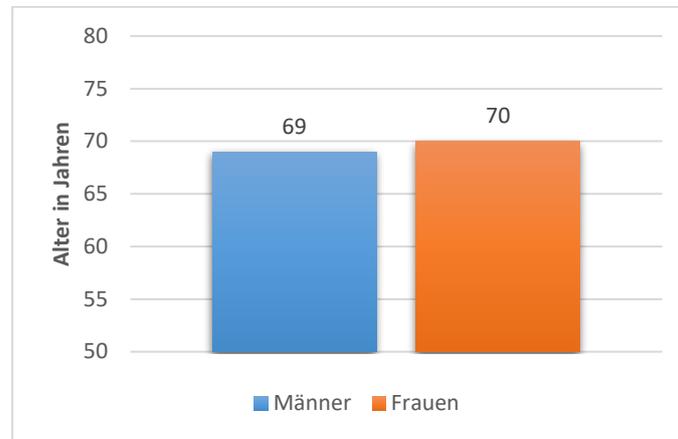


Abb. 20: Durchschnittsalter aller Patienten (n=376) nach Geschlecht

### 3.4 Überblick des eingesandten und analysierten Materials

Die 376 Fälle verteilen sich immunzytochemisch auf 9 Kategorien der Untersuchungsmaterialien, zunächst unabhängig vom Geschlecht wie in der Abbildung 21 dargestellt:

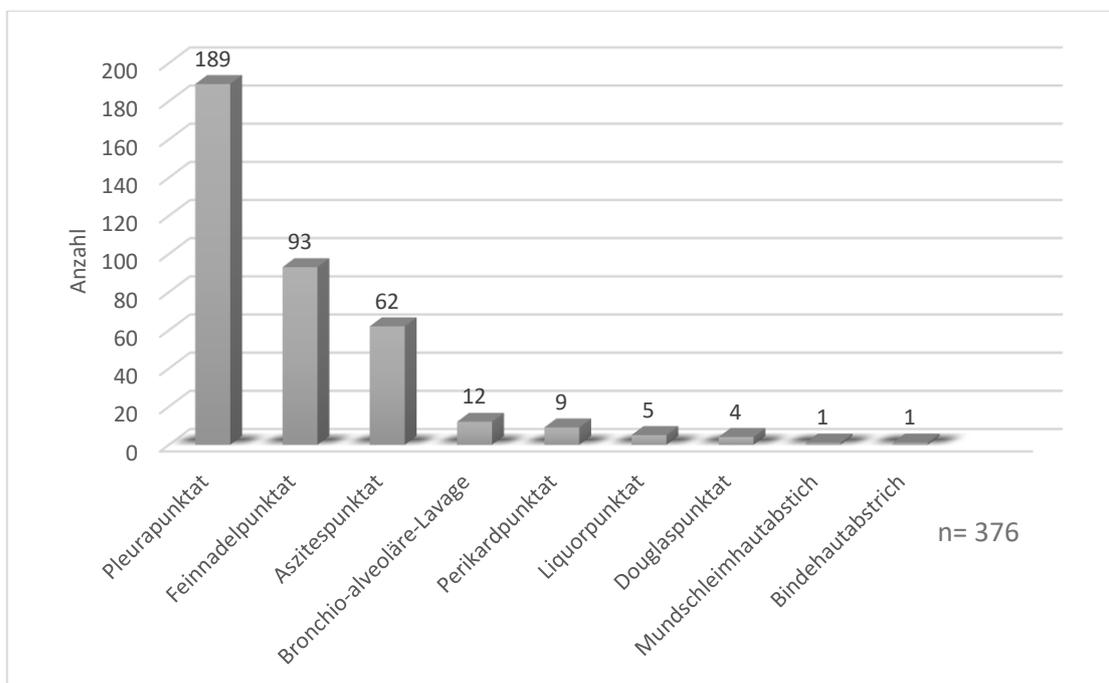
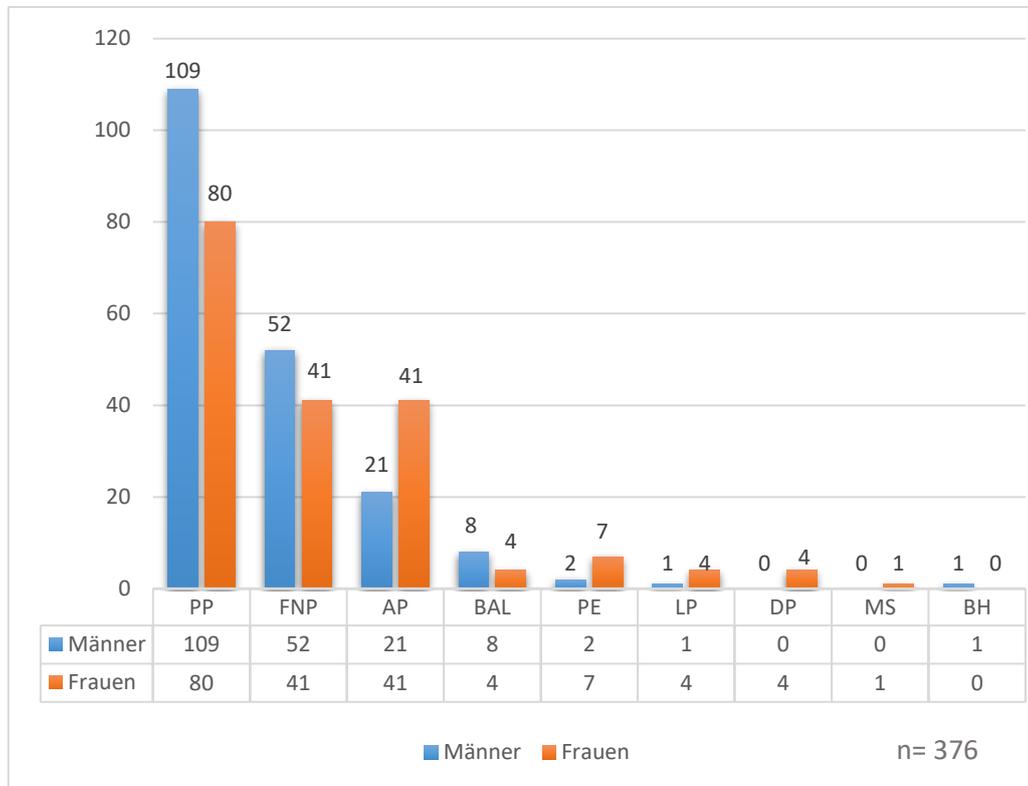


Abb. 21: Art und Anzahl der untersuchten Proben (n=376)

In Abbildung 22 ist die Verteilung der Untersuchungsmaterialien, sortiert nach Geschlecht, dargestellt.

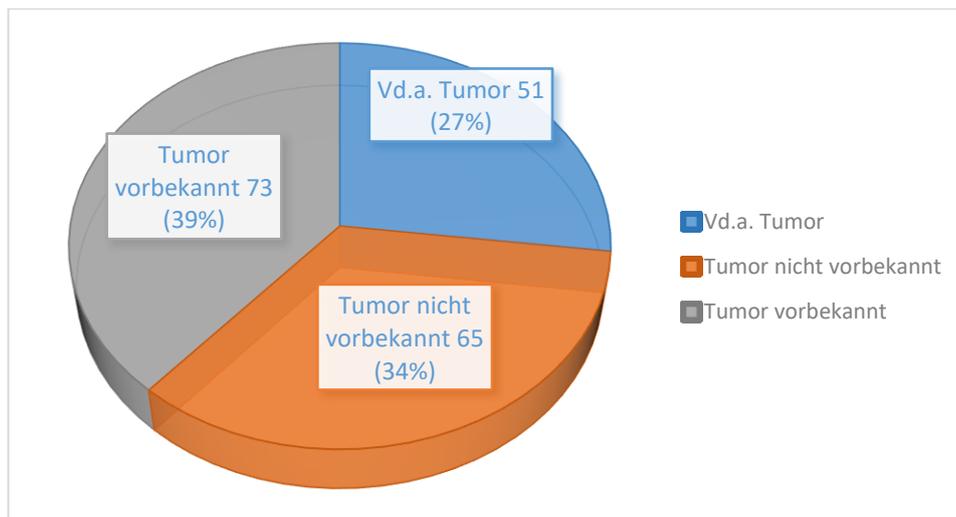


**Abb. 22:** Übersicht der Untersuchungsmaterialien unter Angabe der Anzahl und unter Berücksichtigung der Verteilung auf das Geschlecht

### 3.4.1 Auswertung der Pleurapunktate

Fast genau die Hälfte (n=189) der insgesamt 376 untersuchten Proben entsprechen Pleurapunktaten. Hierbei verteilen sich die Proben auf 109 (58%) Männer und 80 (42%). Frauen.

Inhaltlich geht es bei ihnen wie bei allen Ergusspräparationen im Wesentlichen um die Tumorentifikation in zweifelhaften oder dringend verdächtigen Fällen bzw. um die Tumortypisierung in positiven, manchmal auch in dringend verdächtigen Fällen. Dabei war in 73 Fällen (39%) klinisch-anamnestisch ein Tumor vorbekannt, in 65 (34%) Fällen war kein Tumor vorbekannt, und in 51 (27%) Fällen lag klinisch ein Verdacht auf einen Tumor vor (Abb. 23).



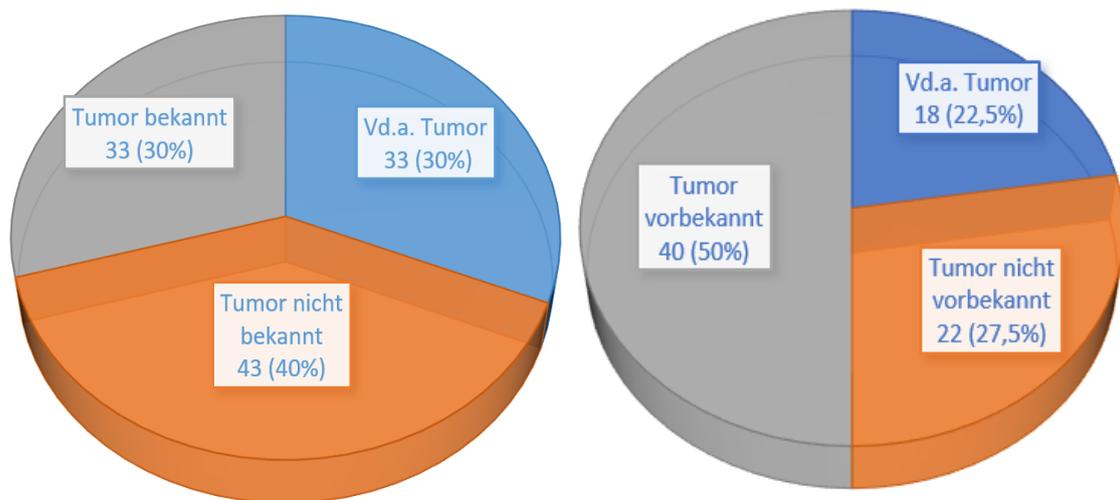
**Abb. 23:** Übersicht der prozentualen Verteilung der 189 Pleurapunktate für Männer und Frauen in die Kategorien: „Tumor unbekannt“, „nicht unbekannt“ und „Verdacht auf Tumor“

Im Folgenden soll die Auswertung für die Pleurapunktate getrennt nach Männern und Frauen erfolgen.

Dies hat damit zu tun, dass sich das zu erwartende Spektrum an Tumoren bei der Typisierung unterschied. Bei Frauen spielen Mammakarzinome bei Pleurakarzinosen eine zahlenmäßig wichtige Rolle, die bei Männern kaum vorkommen. Bei Männern sind hingegen erfahrungsgemäß Lungenkarzinome häufig, außerdem sind berufsanamnestisch bedingt häufiger maligne Mesotheliome als bei Frauen zu bedenken.

Vergleicht man Männer und Frauen bezüglich der drei Kategorien (Abb. 24), so war bei den 109 Männern in 33 Fällen (30%) ein Tumor unbekannt, in 43 Fällen (40%) war kein Tumor unbekannt und in 33 Fällen (30%) bestand bereits ein Verdacht auf einen Tumor. Von den 80 Frauen war bei 40 Fällen (50%) ein Tumor unbekannt, bei 22 Fällen (27,5%) war die Tumoranamnese leer, ein Tumorverdacht bestand bei 18 Fällen (22,5%).

Dieser Unterschied war im Chi<sup>2</sup>-Test statistisch signifikant (p = 0.018; bezogen auf die prozentuale Verteilung).



**Abb. 24:** Übersicht des prozentualen Verhältnisses der Pleurapunktate vor Anwendung der Immunzytochemie in die Kategorien: „Tumor vorbekannt“, „nicht vorbekannt“ und „Verdacht auf Tumor“ (%). Männliche Kohorte (n=109) links, weibliche Kohorte (n=80) rechts

### 3.4.1.1 Auswertung der männlichen Kohorte - Pleurapunktate

Von den insgesamt 109 Patientenproben wurden in 60 Fällen immunzytochemische Untersuchungen zur Tumoridentifikation vorgenommen, darunter in 31 Fällen nach einem Karzinom. Ferner stellte sich in 20 Fällen die Frage nach einem malignen Mesotheliom und in 9 Fällen nach einem malignen Lymphom. An den übrigen 49 Fällen wurde eine Tumortypisierung vorgenommen.

#### 3.4.1.1.1 Immunzytochemische Untersuchungen zur Tumoridentifikation - Pleurapunktate bei Männern

Bei den 31 Proben ging es um eine Identifizierung epithelialer Tumorzellen. Hier zeigte die konventionelle Zytologie in 10 Fällen einen „dringenden Verdacht“ auf eine Tumorzelle, während 19 Proben als „zweifelhaft“ beurteilt wurden. Außerdem wurde eine Probe konventionell-zytologisch als „positiv“ und eine als „negativ“ bewertet und dennoch immunzytologisch mit dem Marker BerEP4 untersucht; diese Proben werden unten separat erläutert. Einen Überblick über die Verteilung der konventionellen-zytologischen Diagnostik und der Enddiagnose nach Anwendung der Immunzytochemie zeigt Tabelle 11.

Zytologische Diagnose	Diagnose nach Immunzytochemie				Gesamt
	Positiv	Dringender Verdacht	Zweifelhaft	negativ	
Positiv	1	-	-	-	<b>1</b>
Dringender Verdacht	6	-	2	2	<b>10</b>
Zweifelhaft	3	2	-	14	<b>19</b>
Negativ	-	-	-	1	<b>1</b>
<b>Gesamt</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>17</b>	<b>31</b>

Tabelle 11: Datenübersicht der konventionell-zytologischen und der immunzytochemischen Befunde zur Tumoridentifikation der Pleurapunktate; männliche Kohorte (n=31)

Der in der Zytologie positive Fall bestätigte sich immunzytochemisch; in 9 weiteren Fällen wurden ebenfalls Tumorzellen detektiert, so dass die Fälle als „positiv“ abgeschlossen werden konnten“. In 2 Fällen ergab sich eine Höherstufung von „zweifelhaft“ auf „dringender Verdacht“, nachdem vereinzelte positive Zellen mit auffälliger Morphologie angetroffen worden waren. Anders herum wurden aber auch jeweils 2 zunächst dringend verdächtige Zellbilder zu „zweifelhaft“ bzw. „negativ“ heruntergestuft. In 14 „zweifelhaften“ Fällen lagen in der Immunzytochemie keine positiven Zellen vor, so dass die Fälle als „negativ“ abgeschlossen wurden. Alle 29 Fälle erfuhr somit eine Diagnosemodifikation. An dem jeweils einen primär positiven bzw. negativen Fall ergaben sich keine Veränderungen der Diagnose.

In zwei Fällen wurden abweichend vom Panel je zwei weitere Marker angewandt. In einer „zweifelhaft“ vorbefundeten Probe wurden bei vorbekanntem Prostata-Ca noch PSA und PSMA eingesetzt. Bei negativem Ausfall der Marker wurde die Diagnose bei „zweifelhaft“ belassen. Der zweite Fall (Zweitbeurteilung bei bekanntem kleinzelligem Bronchialkarzinom) war zytologisch „negativ“ beurteilt worden und wurde bei Negativität von BerEP4, TTF-1 und CD56 auch negativ abgeschlossen.

#### **3.4.1.1.2 Immunzytochemische Auswertung zur Typisierung epithelialer Tumoren - Pleurapunktate bei Männern**

In 49 Proben zeigte die konventionelle Zytologie bereits ein positives Ergebnis und somit den Nachweis von als epithelial eingeschätzten Tumorzellen.

Im Folgenden wurden 46 der insgesamt 49 Proben immunzytochemisch mit Hilfe des klassischen Markerpanels (CK7, CK5, CK20, TTF-1, cdx2) zur Tumortypisierung untersucht. In 3 Fällen wurden bei jeweils vorbekannten Malignomen und nur sehr spärlich vorhandenen Tumorzellen lediglich zielgerichtete Marker und nicht das komplette Panel eingesetzt: Dazu zählten Punktate eines bekannten Bronchialkarzinoms, in dem Fall wurde nur CK7 und CK10 eingesetzt, sowie eines metastasierten Prostatakarzinom bei dem die Marker PSA, PSMA und P504S und eines vorbekannten malignen Melanoms, bei dem nur die Antikörper HMB45 und Melan A angewandt wurden. Hierbei haben sich bei dem Fall mit dem vorbekannten Bronchialkarzinom lediglich Zellen eines Adenokarzinoms definieren lassen, während bei dem vorbekannten metastasiertem Prostatakarzinom, bei vereinzelter schwacher Expression von PSA, Zellen eines Adenokarzinom mit Verdacht auf metastatische Absiedlungen eines Prostatakarzinoms definiert wurden. In dem dritten Fall zeigten sich die Immunmarker HMB45 und Melan A als kräftig positiv, sodass das bekannte maligne Melanom immunzytochemisch bestätigt wurde.

Von den 46 Proben, die mit dem klassischen Markerpanel untersucht wurden, wurden in 9 Fällen zudem Marker bei zum Teil vorbekannten Malignomen ergänzend appliziert.

Hierbei wurde in 4 Proben als zusätzliches Markerpanel bestehend aus CK1/10/11 eingesetzt, naheliegend war hier im Speziellen der Verdacht auf ein Plattenepithelkarzinom oder ein mischdifferenziertes Karzinom der Lunge. In 5 Proben wurden ergänzende Marker wie PSMA/PSA, Uroplakin, RCC, Melan A und HMB45 sowie zusätzlich BerEP4, Calretinin und WT-1, eingesetzt, um ein Prostatakarzinom, ein Harnblasen- sowie Nierenzellkarzinom, ein malignes Melanom sowie differentialdiagnostisch ein Mesotheliom (in Abgrenzung gegenüber einer Pleurakarzinose bei etwaigen Zweitmalignom) bei vorbekanntem Tumor zu typisieren.

Einen Überblick über die ergänzend eingesetzten Antikörper gibt die Tabelle 12. Das hier angewandte klassische Markerpanel, bestehend aus CK7, CK20, CK5/6, cdx2, TTF-1, wird als „P1“ bezeichnet. Die jeweilige immunzytochemische Reaktion wird für die zusätzlichen Marker bei vorliegender Färbereaktion mit „+“ und bei nicht vorhandener Färbereaktion mit „-“ gekennzeichnet:

Fall	Tumor vorbekannt?	Immunzytochemische Marker	Ergebnis
1	Infektexazerbierte COPD + Pneumonie; V.a. maligne Zellen	P1 + CK1/10/11(-)	Pleurakarzinose durch Zellen eines metastasierten Lungenkarzinoms
2	Unklarer Pleuraerguss bei Dyspnoe. Dignität?	P1 + CK1/10/11(-)	Pleurakarzinose durch Zellen eines metastasierten Lungenkarzinoms
3	Unklare pulmonale Raumforderung; V.a. Lungen-Ca.	P1 + CK1/10/11 (+)	Pleurakarzinose durch Zellen eines adeno-squamösen Lungen-Ca.
4	Unklarer exsudativer Pleuraerguss, Verdacht auf Bronchialkarzinom	P1 + CK1/10/11(+)	Pleurakarzinose durch Zellen eines adeno-squamösen Lungen-Ca.
5	Zustand nach Prostatakarzinom	P1 + PSA (-)	Pleurakarzinose durch ein Adenokarzinom; vorrangig Lungen-Ca.
6	Z.n. Nierenbecken-Ca. und Z.n. NTx; V.a. Karzinose	P1 + Uroplakin (-)	Pleurakarzinose, vorrangig gering differenziertes Lungen-Ca.
7	Infiltrativ destruierender Prozess in der Lunge; Verdacht auf malignes Mesotheliom, DD-Bronchialkarzinom	P1 + BerEP4 (+), Calretinin (-), WT1 (-)	Pleurakarzinose durch Zellen eines metastasierten Lungenkarzinoms
8	Bekanntes Nierenzell-Ca.	P1 + RCC (+)	Pleurakarzinose durch Zellen eines Nierenzell-Ca.
9	Bekanntes malignes Melanom	P1 + MelanA + HMB45 (jeweils (+))	Pleurakarzinose durch Zellen des bekannten malignen Melanoms

**Tabelle 12:** Übersicht über die Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchung bei der Tumortypisierung unter Berücksichtigung ergänzend eingesetzter Marker; männliche Kohorte der Pleurapunktate (n=9)

Bezogen auf alle 49 Fälle konnte bei 47 von ihnen ein Primarius neu typisiert oder bestätigend typisiert werden.

- 42 Fälle entsprachen Lungenkarzinomen (36 Adenokarzinome, 2 adeno-squamöse Karzinome und 4 Karzinome, bei denen es sich sehr wahrscheinlich um Plattenepithelkarzinome handelte),
- in 2 Fällen lag ein malignes Melanom vor,
- in einem Fall ein Karzinom des Oberbauchs (Pankreas, DD Magen),
- in einem Fall ein Prostatakarzinom und
- in einem Fall ein Nierenzellkarzinom,

Lediglich zwei Proben waren bei geringem Tumorzellgehalt eines Adenokarzinoms und nicht auswertbarer Immunzytochemie nicht näher typisierbar. Eine Probe davon war nach immunzytochemischer Auswertung eher weniger wahrscheinlich für Zellen eines vermuteten Bronchialkarzinoms als vielmehr vereinbar mit einem malignen Mesotheliom eingestuft worden.

#### **3.4.1.1.3 Immunzytochemische Auswertung von Fällen bei Verdacht auf malignes Mesotheliom bzw. malignes Lymphom bei Männern**

##### **Malignes Mesotheliom:**

In 20 Proben ging es primär um den Nachweis bzw. den Ausschluss von Tumorzellen eines malignen Mesothelioms, teilweise bei bereits vorbekanntem Mesotheliom. Die klassischen Marker, welche zur immunzytochemischen Diagnostik eingesetzt wurden, sind BerEP4, Calretinin, Mesothelin, EMA und WT1. In den meisten Fällen (n=17) wurde ausschließlich das genannte Markerpanel angewandt, während in drei Proben ergänzende Marker eingesetzt wurden: In zwei Proben wurden zum differentialdiagnostischen Ausschluss zusätzlich die Marker CK20, CK7 und TTF-1 eingesetzt. In beiden Fällen wurde abschließend ein malignes Mesotheliom diagnostiziert. In der dritten, zytologisch negativen Probe wurde bei vorbekanntem Prostatakarzinom ergänzend PSA, PSMA und AMACR eingesetzt. Das Ergebnis fiel hier negativ für Tumorzellen aus.

Die Ergebnisse nach Anwendung der Immunzytochemie fasst die folgende Tabelle 13 zusammen:

Zytologische Diagnose	Diagnose nach Immunzytochemie				Gesamt
	positiv	Dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ	
Positiv	12	-	-	-	<b>12</b>
Dringender Verdacht	-	1	-	2	<b>3</b>
Zweifelhaft	2	1	-	1	<b>4</b>
Negativ	-	-	-	1	<b>1</b>
<b>Gesamt</b>	<b>14</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>20</b>

Tabelle 13: Datenübersicht der konventionell-zytologischen und der immunzytochemischen Befunde zur Tumortypisierung eines malignen Mesothelioms der Pleurapunktaten; männliche Kohorte (n=20)

Insgesamt zeigten 14 der insgesamt 20 Proben Zellen eines malignen Mesothelioms. Dabei wurden die 12 zytologisch positiven Fällen als Mesotheliome identifiziert, ferner 2 zuvor zweifelhafte Proben. Eine Probe die zuvor als „dringend tumorverdächtig“ eingestuft wurde, blieb unverändert, eine zuvor als „zweifelhaft“ eingestufte Probe wurde auf „dringend verdächtig“ angehoben. In 3 zuvor dringend verdächtig bzw. zweifelhaften Befunden wurde zusätzlich eine DNA-Bildzytometrie und eine AgNOR-Analyse durchgeführt. Das Ergebnis zeigte in einer Probe Werte, die für den Nachweis von malignen Zellen sprachen, während in der anderen Probe schlussendlich reaktive Mesothelzellveränderungen definiert wurden. Bei dem konventionell-zytologisch-negativem Befund handelte es sich um den oben angesprochenen Konsilfall; das Zellbild sprach in Zusammenschau mit der Immunzytochemie für einen mesothelzell- und makrophagenreichen reaktiven Pleuraerguss.

### **Lymphatische Erkrankungen / Lymphom:**

In neun Fällen wurde das immunzytochemische Markerpanel zur Typisierung eines Lymphoms bzw. einer lymphatischen Erkrankung eingesetzt. Hierzu zählen vorrangig die Antikörper CD20 und LCA/CD45RO. Lediglich in zwei der neun Proben wurde jeweils BerEP4 zusätzlich bei klinischem Verdacht auf ein Bronchialkarzinom eingesetzt. Die Ergebnisse der Auswertung zeigt Tabelle 14:

Zytologische Diagnose	Diagnose nach Immunzytochemie				Gesamt
	positiv	Dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ	
Positiv	2	-	-	-	<b>2</b>
Dringender Verdacht	-	-	-	-	-
Zweifelhaft	-	1	-	-	<b>1</b>
Negativ	-	1	-	5	<b>6</b>
<b>Gesamt</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	-	<b>5</b>	<b>9</b>

Tabelle 14: Datenübersicht der konventionell-zytologischen und der immunzytochemischen Befunde zur Tumortypisierung einer lymphatischen Erkrankung / eines Lymphoms der Pleurapunktate; männliche Kohorte (n=9)

Durch die Immunzytochemie wurden insgesamt zwei Fälle, die zytologisch als negativ bzw. zweifelhaft eingeordnet worden waren, jetzt als dringend verdächtig eingestuft, da sich suspekta bzw. an Zahl vermehrte Zellen der B-Zell-Reihe gezeigt hatten. Die übrigen sieben Diagnosen blieben durch die Immunzytochemie unverändert positiv (n=2) bzw. negativ (n=5).

### 3.4.1.2 Auswertung der weiblichen Kohorte - Pleurapunktate

Bei den 80 Patientenproben ging es in 31 Fällen um die Tumoridentifikation eines Karzinoms, in 24 Fällen um die Typisierung eines Karzinoms, in 2 Fällen um die Frage nach einem malignen Mesotheliom und in 14 Fällen nach einem malignen Lymphom; außerdem wurde in neun Fällen metastasierter Mammakarzinome eine Bestimmung von ER, PR und Her-2/neu durchgeführt.

#### 3.4.1.2.1 Immunzytochemische Untersuchungen zur Tumoridentifikation - Pleurapunktate bei Frauen

Von den insgesamt 80 Patientinnen zeigte in 31 Proben die konventionelle Zytologie „dringend tumorverdächtige“ (n=7) bzw. „zweifelhafte“ (n=24) Befunde. Diese Fälle sowie jeweils 1 „negativer“ und 1 „positiver“ Befund wurden mit BerEP4 und

HEA125 auf das Vorliegen von Tumorzellen untersucht. Bei dem zytologisch „positiven“ Befund wurde zudem ergänzend Calretinin (bei bekannten malignen Mesotheliom) eingesetzt. Ein Fall, der zytologisch eine negativ war, wurde dennoch immunzytochemisch untersucht; der Grund hierfür ließ sich nicht mehr eruieren. Auch eine Wiederholungspunktion bestätigte den tumorzell-negativen Befund. Die Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchung fasst Tabelle 15 zusammen:

Zytologischer Befund	Immunzytochemischer Befund				Resultat
	positiv	Dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ	
Positiv	1	-	-	-	<b>1</b>
Dringender Verdacht	5	-	-	2	<b>7</b>
Zweifelhaft	2	4	-	18	<b>24</b>
Negativ	-	-	-	1	<b>1</b>
<b>Resultat</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	-	<b>21</b>	<b>33</b>

Tabelle 15: Datenübersicht der konventionell-zytologischen und der immunzytochemischen Befunde zur Tumoridentifikation der Pleurapunktate; weibliche Kohorte (n=33)

Somit konnten mit Hilfe von BerEP4 und HEA125 in 7 Fällen, davon zuvor zweifelhaften (n=2) oder dringend verdächtigen (n=5), Tumorzellen sicher identifiziert werden und in 4 Fällen die Diagnose bei nur vereinzelt positiven Zellen von „zweifelhaft“ auf „dringender Verdacht“ angehoben werden. In 20 Fällen wurde ein Tumordverdacht immunzytochemisch ausgeräumt. Nur die beiden ohnehin schon vorher klaren Diagnosen (jeweils ein negativer und ein positiver Fall) blieben bestehen.

#### **3.4.1.2.2 Immunzytochemische Auswertung zur Typisierung epithelialer Tumoren - Pleurapunktate bei Frauen**

An den 24 positiven wurde mit dem klassischen Markerpanel zur Abklärung unklarer Ergüsse bei Frauen untersucht, jedoch wurden in über der Hälfte der Proben (n=13) ergänzende Antikörper eingesetzt (Tabelle 16). Das klassische Markerpanel, welches für Frauen aus CK7, CK20, CK5/6, cdx2, TTF-1 und CA125 besteht, wird als

„P1“ bezeichnet. Die jeweilige immunzytochemische Reaktion wird für die zusätzlichen Marker bei vorliegender positiver Färbereaktion mit „+“ und bei nicht vorhandener Färbereaktion mit „-“ gekennzeichnet:

Fall	Tumor vorbekannt?	Immunzytochemische Marker	Ergebnis
1	Ossär metastasiertes Bronchialkarzinom	P1 + CD56 (+)	Pleurakarzinose durch ein kleinzelliges Lungenkarzinom
2	Z.n. Zervixkarzinom	P1 + CK1+CK10+CK11(+)	Pleurakarzinose durch ein Ovarialkarzinom / DD Zervixkarzinom
3	Schilddrüsenkarzinom	P1 + Thyreoglobulin (+)	Pleurakarzinose durch ein Schilddrüsenkarzinom
4	V.a. nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	P1 + Melan A, HMB45 (je -)	Pleurakarzinose durch ein Lungenkarzinom
5	Axilläres CUP-Syndrom eines Adenokarzinoms	P1 + BerEP4 (+), Calretinin, Mesothelin, WT1 (je-)	Pleurakarzinose durch ein Ovarialkarzinom / DD Lungenkarzinom
6	Z.n. HCC, Z.n. LTx	P1 + HepPar1 (-)	Pleurakarzinose durch ein Ovarialkarzinom
7	Nein	P1 + Mammaglobin (+), ER, PR, und Her-2-neu (je -)	Pleurakarzinose; ggfls. Mammakarzinom, bei schwacher Mammaglobin-Expression
8	Z.n. Mammakarzinom; V.a. Bronchialkarzinom	P1 + Mammaglobin (+), ER (+) und PR (+)	Pleurakarzinose ein Mammakarzinom
9	Metastasiertes Adenokarzinom der Lunge; jetzt RF der Mamma	P1 + Mammaglobin, ER, PR, Her-2-neu (je -) bei TTF-1 (-)	Pleurakarzinose durch ein Adenokarzinom, nicht zuordbar

10	Z.n. nach Mammakarzinom, jetzt CUP-Syndrom	P1 + Mammaglobin, ER, PR und Her-2-neu (je-)	Pleurakarzinose durch ein Ovarialkarzinom
11	CUP-Syndrom	P1 + Mammaglobin (-)	Pleurakarzinose durch ein Adenokarzinom, nicht zuordbar
12	Z.n. Mammakarzinom, jetzt RH in der Lunge	P1 + Mammaglobin (+), ER (+), PR (-) und Her-2-neu (-)	Pleurakarzinose durch ein Mammakarzinom
13	CUP-Syndrom	P1 + Mammaglobin (+) bei TTF-1 (+)	Pleurakarzinose durch ein Mamma-Ca. oder ein Lungen-Ca.

Tabelle 16: Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchung unter Berücksichtigung ergänzend eingesetzter Marker bei der Tumortypisierung; weibliche Kohorte der Pleurapunktate (n=13); (+) = immunzytochemisch positiv, (-) immunzytochemisch negativ

In acht der 13 Fälle ließen sich die Tumoren, allesamt Adenokarzinome, einem bestimmten Organ zuordnen, und zwar drei einem Mammakarzinom, zwei einem Lungenkarzinom, zwei einem Ovarialkarzinom und einer einem Schilddrüsenkarzinom. In drei Fällen waren Eingrenzungen (Ovar/Zervix bzw. Ovar/Lunge bzw. Mamma/Lunge) möglich, und in zwei Fällen blieb die Tumorerkrankung offen (Fall 9 und 11).

In den 11 Fällen, welche lediglich mit dem Panel „P1“ untersucht worden waren, konnten die Tumorzellen in 2 Fällen einem pulmonalen Adenokarzinom, in 2 Fällen einem Ovarialkarzinom und in einem Fall einem Mammakarzinom zugeordnet werden. In insgesamt 6 der 11 Fälle boten sich differentialdiagnostische Möglichkeiten für folgende Primärtumore an: in 2 Fällen sprach das Ergebnis für ein Ovarialkarzinom (DD Mammakarzinom), in 2 Fällen wurde an ein Magen- oder Pankreaskarzinom (DD Lungen- oder Mammakarzinom) und in zwei Fällen an ein Lungenkarzinom (DD Mamma- oder Ovarialkarzinom) gedacht.

Insgesamt konnten die Tumorzellen somit in 13 der 24 Fälle einem Primärtumor zugeordnet werden; 9 Fälle konnten differentialdiagnostisch eingegrenzt werden, zwei blieben offen.

### 3.4.1.2.3 Immunzytochemische Auswertung von Fällen bei Verdacht auf malignes Mesotheliom bzw. malignes Lymphom bei Frauen

#### Malignes Mesotheliom:

In 2 der 80 Proben lag der klinische Verdacht auf ein malignes Mesotheliom vor. Die konventionelle-Zytologie zeigte hier ein „positives“ und ein „zweifelhaftes“ Ergebnis. Immunzytochemisch fand das klassische Markerpanel zur Typisierung eines malignen Mesothelioms Anwendung, allerdings wurde bei dem „zweifelhaften“ Befund ergänzend CD146 (MUC18), ein Antikörper zur epithelialen Zelldifferenzierung, eingesetzt. Nach Anwendung der Immunzytochemie konnte für den „positiven“ Befund das Vorliegen von Zellen eines malignen Mesothelioms (in Abgrenzung gegenüber einer Pleurakarzinose) bestätigt werden, während für den konventionell-zytologisch „zweifelhaften“ Befund es, auch nach Anwendung einer weiteren adjunktiven Methode, der DNA-Zytometrie, bei „zweifelhaft“ blieb.

#### Lymphatische Erkrankungen / Lymphom:

12 Fälle wurden mit Hilfe des immunzytochemischen Markerpanels zur Abklärung eines Lymphoms bzw. lymphatischer/plasmazellulärer Systemerkrankungen untersucht. Bei 11 der 12 Patientinnen war jeweils eine einschlägige Vorerkrankung bekannt. Hierzu zählten Lymphome, die CLL und das multiple Myelom. Die Ergebnisse nach Anwendung der Immunzytochemie zeigt die folgende Tabelle 17:

Zytologischer Befund	Immunzytochemischer Befund				Resultat
	Positiv	Dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ	
Positiv	2	-	-	-	2
Dringender Verdacht	1	-	-	-	1
Zweifelhaft	-	-	-	2	2
Negativ	1	-	-	6	7
<b>Resultat</b>	<b>4</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>8</b>	<b>12</b>

Tabelle 17: Datenübersicht der konventionell-zytologischen und der immunzytochemischen Befunde zur Tumortypisierung einer lymphatischen/plasmazellulären Erkrankung / eines Lymphoms der Pleurapunktate; weibliche Kohorte (n=12)

Fasst man zusammen, so wurden die beiden bereits konventionell-zytologisch positiven Fälle bestätigt. Ein Fall, der zuvor als dringend verdächtig eingestuft wurde, konnte schlussendlich als tumorzell-positiv bestätigt werden, während ein negativer Fall als Lymphom identifiziert und in zwei zweifelhaften Fällen ein Lymphominfiltrat ausgeschlossen werden konnte.

#### **3.4.1.2.4 Immunzytochemische Auswertung von Fällen mit ausschließlicher prädiktiver immunzytochemischer Diagnostik an Pleurakarzinomen von Mammakarzinomen**

Es gab neun Fälle unter den Pleurapunktaten, bei denen in der Anamnese der Patientinnen ein Mammakarzinom bereits bekannt war und in der Zytologie Tumorzellen nachgewiesen worden waren. Immunzytochemisch wurde das Antikörper-Panel aus ER, PR und Her-2-neu eingesetzt. In 2 Fällen wurde ergänzend der Antikörper Mammaglobin und in einem anderen Fall TTF-1 bei Verdacht auf ein Bronchialkarzinom verwendet, wobei schlussendlich die Entscheidung für Zellen eines Mammakarzinoms bei positiver Färbereaktion für Mammaglobin ausfiel. In acht Fällen ergaben sich hier aus methodischer Sicht verlässliche Färberesultate.

#### **3.4.1.3 Zusammenfassender Überblick der Resultate der immunzytochemischen Untersuchung der Pleurapunktate – männliche und weibliche Kohorte**

Insgesamt wurden geschlechterübergreifend im Untersuchungszeitraum 189 Pleurapunktate immunzytochemisch untersucht, bei denen zusammenfassend verschiedene Fragestellungen vorlagen.

#### **Identifikation epithelialer Tumorzellen (n = 64)**

60 Fälle waren primär zytologisch als „dringender Verdacht“ oder „zweifelhaft“ eingestuft gewesen. Keiner dieser Fälle verblieb nach der ergänzenden Immunzytochemie in seiner Kategorie.

Von den 17 „dringend verdächtigen“ Ergusspunktaten wurden 11 als „positiv“ für Tumorzellen identifiziert, sechs wurden zurückgestuft. Davon wurden zwei als „zweifelhaft“, also mit Restverdacht, interpretiert und vier als „negativ“ eingeordnet.

Bei den 43 „zweifelhaften“ Fällen wurden in fünf Fällen Tumorzellen gefunden („positiv“) und sechs Fälle als „dringend verdächtig“ eingeordnet. 32 Fälle wurden als „negativ“ für Tumorzellen abgeschlossen.

Die Immunzytochemie war somit in allen Fällen diagnostisch hilfreich (100%) und konnte zur Klärung der klinischen bzw. morphologischen Fragestellung beitragen.

Ferner wurden vier Fälle mit untersucht, für die diese Anwendung gar nicht gedacht war. Jeweils ein „positiver“ und ein „negativer“ Fall bei Männern und Frauen wurde auf das Vorliegen epithelialer Tumorzellen untersucht, was formal bei der in der Primärdiagnostik gewählten Diagnosekategorie nicht mehr notwendig gewesen wäre. Die Gründe waren hierfür wie folgt:

In einem Fall zeigte die konventionelle Zytologie ein positives Bild für eine Pleurakarzinose eines metastasierten, undifferenzierten großzelligen Karzinoms. Allerdings lagen nicht mehr ausreichend Tumorzellen für die Auswertung der immunzytochemischen Untersuchung vor, sodass eine Bestätigung durch die Immunzytochemie nicht möglich war.

Der 2. Fall war zytologisch negativ bewertet worden, wobei extern im Rahmen einer externen Zytozentrifugation Zellen eines metastasierten kleinzelligen Bronchialkarzinoms diagnostiziert worden war, sodass trotz negativer Zytologie ergänzende immunzytochemische Färbungen mit BerEP4, CD56 sowie TTF-1 durchgeführt worden sind. Die jeweiligen Färbereaktionen fielen aber negativ aus.

Der 3. Fall entsprach einem Konsilfall, bei dem 8 bereits gefärbte Präparate eingesandt worden waren. Tumorzellen konnten zytologisch nicht gesichert werden, sodass ergänzende Immunfärbungen durchgeführt worden sind. Dabei fielen die epithelialen Marker negativ aus, während Calretinin eine positive Färbereaktion zeigte, sodass das Zellbild einem hämorrhagischen, mesothelzell- und makrophagenreichen Pleuraerguss entsprach.

Der 4. Fall war zytologisch als tumorzellnegativ bewertet worden, bei allerdings wenig verdächtigen Zellen wurde BerEP4 und HEA125 eingesetzt, die jedoch keine positive Färbereaktion zeigten und dementsprechend der Befund als tumorzellnegativ eingestuft wurde.

### **Typisierung epithelialer Tumoren (n = 73)**

Bei der Typisierung ergab sich zusammenfassend:

- 46 Fälle wurden als Pleurakarzinosen eines Lungenkarzinoms diagnostiziert, darunter die große Mehrzahl (n=39) als Adenokarzinome identifiziert. 4 Fälle waren mit einem Plattenepithelkarzinom der Lunge zu vereinbaren, zwei konnten durch Hinzunahme anderer Marker Tumordinfiltrate eines adeno-squamösen Karzinoms und in einem Fall eines kleinzellig-neuroendokrinen Karzinoms nachgewiesen werden.
- 4 Fälle stammten von Mammakarzinomen, weitere
- 4 Fälle von Ovarialkarzinomen, und
- jeweils 1 Fall ging auf ein Prostatakarzinom, ein Nierenzellkarzinom bzw. ein Schilddrüsenkarzinom zurück.

Zwei Fälle erwiesen sich als Absiedlungen von malignen Melanomen. In 10 Fällen konnten differentialdiagnostische Eingrenzungen der Tumorherkunft erreicht werden, vier Fälle blieben von der Typisierung her offen.

Zusammenfassend erwies sich somit die Immunzytochemie in 69 von 73 Fällen (94,5%) als diagnostisch weiterführend.

### **Abgrenzung maligner Mesotheliome (n = 22)**

In 13 Ergusspräparaten war zytologisch eine „positive“ Diagnose in Richtung eines malignen Mesothelioms gestellt worden. Mithilfe des entsprechenden Panels (BerEP4, Calretinin, Mesothelin, EMA, WT1) wurden in allen Fällen die entsprechenden Zellen als mesothelialer Natur bestätigt.

Alle drei Fälle mit „dringendem Verdacht“ in der Zytologie wurden uminterpretiert. Einer wurde nach der Immunzytochemie als „positiv“ für Mesotheliomzellen abgeschlossen, zwei als negativ.

Von fünf „zweifelhaften“ Fällen in der Zytologie blieb einer in dieser Kategorie, hier wurden vier Diagnosekategorien verändert. Zwei Fälle wurden als „positiv“ für Mesotheliomzellen interpretiert, einer als „dringender Verdacht“, einer als „negativ“.

Ein Fall, der als „negativ“ befundet war, wurde offenbar außer der Reihe mit dem Markerpanel untersucht, wobei sich keine Hinweise auf ein Mesotheliom fanden. Insgesamt ließ sich in 21 der 22 Fälle ein diagnostischer Wert der immunzytochemischen Untersuchungen erbringen (95,4%).

### **Abgrenzung lymphatischer Erkrankungen / Lymphome (n = 21)**

Das diagnostische Vorgehen in dieser Untergruppe unterschied sich von vornherein von dem in den vorgenannten Gruppen. Bei entsprechender Anamnese der Patienten wurden hier verschiedentlich auch zytologisch „negative“ Proben dennoch weiter untersucht, insgesamt 13 bei 21 Fällen (61,9%). Nur in 5 Fällen bestand eine „positive“ oder „dringend verdächtige“ Zytologie, drei Fälle waren „zweifelhaft“.

Nach Durchführung der Immunzytochemie bestätigten sich in den vier „positiven“ Fällen die Lymphomdiagnosen, der einzige „dringend verdächtige“ wurde „positiv“ abgeschlossen. Von den drei „zweifelhaften“ Fällen erwiesen sich abschließend zwei als „negativ“, in einem wurde ein „dringender Verdacht“ auf ein Lymphom geäußert. Die 13 zytologisch „negativen“ Ergüsse enthielten nach Immunzytochemie in einem Fall Lymphomzellen („positiv“) und in einem weiteren einen „dringenden Verdacht“ hierauf; die übrigen 11 blieben „negativ“.

Insgesamt war somit eine immunzytochemische Präzisierung der Diagnose bzw. vollständige Klärung in 11 der 13 Fälle möglich (84,6%).

### **3.4.2 Auswertung der Perikardpunktate**

Aufgrund der geringen Zahl von nur neun der 376 Proben (2,4%) sollen die immunhistochemisch untersuchten Perikardpunktate im Anschluss an die Pleurapunktate abgehandelt werden. Dieses deswegen, weil Pleura- und Perikardergüsse nicht nur topographisch eng benachbarte Regionen betreffen, sondern auch häufiger synchron auftreten und daher auch inhaltliche Überschneidungen bestehen.

Wie auch in den folgenden Probenkategorien wird für die Perikardpunktate für den detaillierten Überblick eine individuelle Darstellung der Daten gewählt, hierbei wird die überschaubare Kohorte für Männer und Frauen zusammengefasst. Zwei der Proben stammten von Männern, sieben von Frauen. In drei Fällen (33%) war ein

Tumor vorbekannt, in einem Fall bestand ein klinischer Verdacht auf einen Tumor (11%). Die übrigen fünf Fälle (56%) wiesen keinen Tumorverdacht auf.

### 3.4.2.1 Immunzytochemische Untersuchungen zur Tumoridentifikation - Perikardpunktate

In allen 4 Fällen zeigte die konventionelle Zytologie einen zweifelhaften Befund bzgl. epithelialer Tumorzellen, so dass das Markerpanel zur Tumoridentifikation (BerEP4, HEA125) eingesetzt wurde (Fälle 1-4 der Tabelle 18). Bei dem Fall 1 und 2 war jeweils kein Tumor, während in dem Fall 3 und 4 jeweils ein Tumor vorbekannt war. In der ersten Probe konnte bei „geringer Zellzahl“ lediglich ein Verdacht auf Tumorzellen geäußert werden, während in dem zweiten Perikarderguss keine Tumorzellen nachgewiesen wurden. In einer Probe (Fall 3) konnten bei vorbekanntem Zervixkarzinom Tumorzellen eines Plattenepithelkarzinoms – und somit gut vereinbar mit Zellen des bekannten Zervixkarzinoms - identifiziert werden.

In einem weiteren Fall (Fall 4 der Tabelle 18) fand sich ein zweifelhafter Befund, und zwar bei bekanntem Non-Hodgkin-Lymphom. Hier ergab sich durch Anwendung von CD45RO und CD20 als ergänzende Marker kein Hinweis auf eine Lymphominfiltration.

Fall	Tumor vorbekannt?	Konventionelle Zytologie	Immunzytochemische Marker	Ergebnis
1	Nein	zweifelhaft	BerEP4 und HEA125 in jeweils einigen Zellen (+)	Dringender Verdacht auf maligne epitheliale Tumorzellen; Wiederholung empfohlen
2	Nein	zweifelhaft	BerEP4 und HEA125 (jeweils -)	Mesothelzellreicher Erguss
3	Ja Zervixkarzinom	zweifelhaft	BerEP4 und HEA125 (jeweils +)	Zellen eines Plattenepithelkarzinoms; gut vereinbar einem Zervixkarzinom
4	Ja (NHL)	zweifelhaft	CD45RO (+) CD20 (-)	Reine-T-Zell-Population. Kein Nachweis eines NHL

**Tabelle 18:** Darstellung der Ergebnisse der konventionell-zytologisch und immunhistochemisch zur Tumoridentifikation untersuchten Perikardpunktate (n=4 Frauen) unter Berücksichtigung der klinischen Angaben; (+) = positive immunzytochemische Reaktion, (-) = negative immunzytochemische Reaktion

### **3.4.2.2 Immunzytochemische Auswertungen zur Tumortypisierung - Perikardpunktate**

Bei insgesamt fünf Patienten wurden immunzytochemische Untersuchungen zur Tumortypisierung vorgenommen. Das klassische Markerpanel P1 aus CK7, CK20, CK5/6, cdx2, TTF-1 (bei Frauen ergänzt um CA125) war geeignet, alle fünf Fälle zu lösen.

Bei beiden betroffenen Männern, bei denen die Tumoranamnese leer war, ging die Perikardkarzinose auf ein Adenokarzinom der Lunge zurück. Bei einer Frau ließ sich die Tumordinfiltration auf ein Ovarialkarzinom zurückführen.

Bei einer weiteren Frau mit vorbekanntem Kolonkarzinom und Mammakarzinom wurde Mammaglobin hinzugenommen (+) und bei CK20 (-) und cdx-2 (-) der Tumor einem Mammakarzinom zugeordnet.

Bei einer weiteren Patientin bestand klinischerseits Verdacht auf ein Mammakarzinom, so dass um eine ergänzende Bestimmung der prädiktiven Marker (ER, PR, Her-2-Neu) gebeten wurde. Unerwartet ergab sich hier (unter Hinzunahme auch von Mammaglobin) eine starke TTF-1-Positivität und eine Rezeptornegativität, so dass ein Adenokarzinom der Lunge Ursache der Perikardkarzinose war.

### **3.4.2.3 Zusammenfassender Überblick der Perikardpunktate**

Zusammenfassend konnten in einem der vier zweifelhaften Fälle Tumorzellen nachgewiesen und in einem weiteren Fall wahrscheinlich gemacht werden, wobei die Empfehlung einer erneuten Punktatgewinnung offenbar nicht umgesetzt wurde. Im dritten und vierten Fall wurden Tumorzellen ausgeschlossen. Alle vier zweifelhaften Diagnosen wurden somit modifiziert (100%) und durch die Immunzytochemie in jeweils einmal in positiv und dringender Verdacht sowie zweimal negativ umgewandelt.

In den fünf Fällen, in denen eine Tumortypisierung vorgenommen wurden, konnten alle fünf Fälle mit positiver zytologischer Diagnose erfolgreich einem Primärtumor zugeordnet werden (100%).

### 3.4.3 Auswertung der Feinnadelpunktate (FNP)

Die zweitgrößte Kohorte nach den Pleurapunktaten entsprach den Feinnadelpunktaten (FNP). Die insgesamt 93 untersuchten Proben (25%) verteilen sich auf 52 Patienten (56%) und 41 Patientinnen (44%). In 48 Fällen (52%) war ein Tumor vorbekannt, in 29 Proben (31%) gab es klinischerseits bereits einen Tumorverdacht und in 16 Proben (17%) war weder ein Tumor vorbekannt, noch ein Verdacht gegeben (Abb. 25):

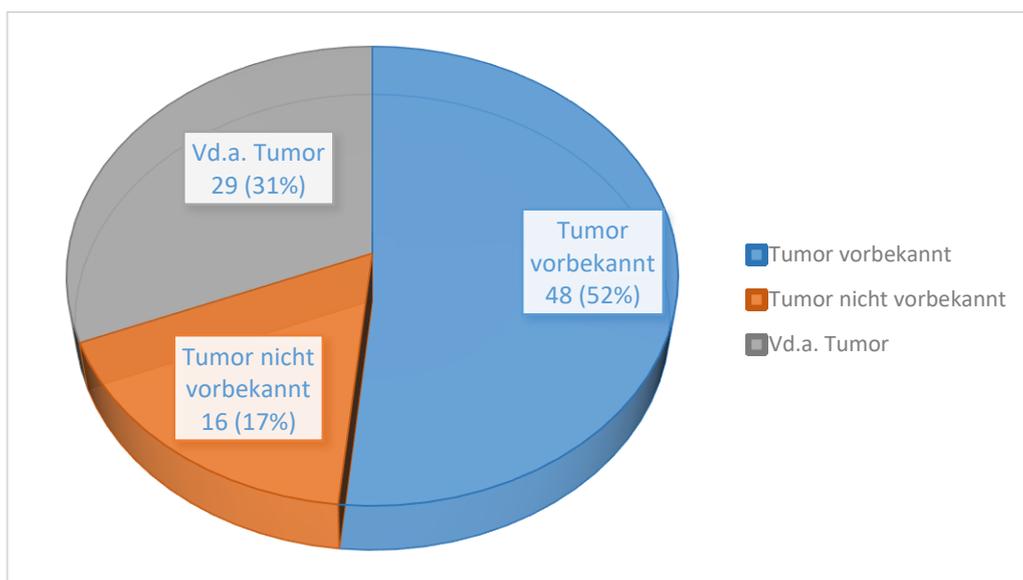


Abb. 25: Übersicht der prozentualen Verteilung der 93 Feinnadelpunktate für Männer und Frauen in die Kategorien: „Tumor vorbekannt“, „nicht vorbekannt“ und „Verdacht auf Tumor“

Die Feinnadelpunktete stammten aus verschiedenen Organen. Hierzu gehören schwerpunktmäßig die Lymphknoten ganz verschiedener Körperregionen und die Leber, daneben die Lunge, der Magen und das Pankreas.

Die selteneren Punktete diverser anderer Lokalisationen (Mediastinum, Peritoneum und Retroperitoneum, Nebennieren, Weichteilgewebe / Muskulatur) werden in der folgenden Auswertung der Kategorie „Sonstige“ zusammengefasst.

### 3.4.3.1 Auswertung der männlichen Kohorte - FNP

Betrachtet man die Art der eingesandten Proben der 52 Patienten, so ergibt sich folgende Verteilung der untersuchten Proben: 18 Lymphknotenpunktate, 17 Leberpunktate, 3 Lungen-, 3 Magen- und 2 Pankreaspunktate sowie 9 in der Kategorie Sonstige, wie die Abbildung 26 veranschaulicht:

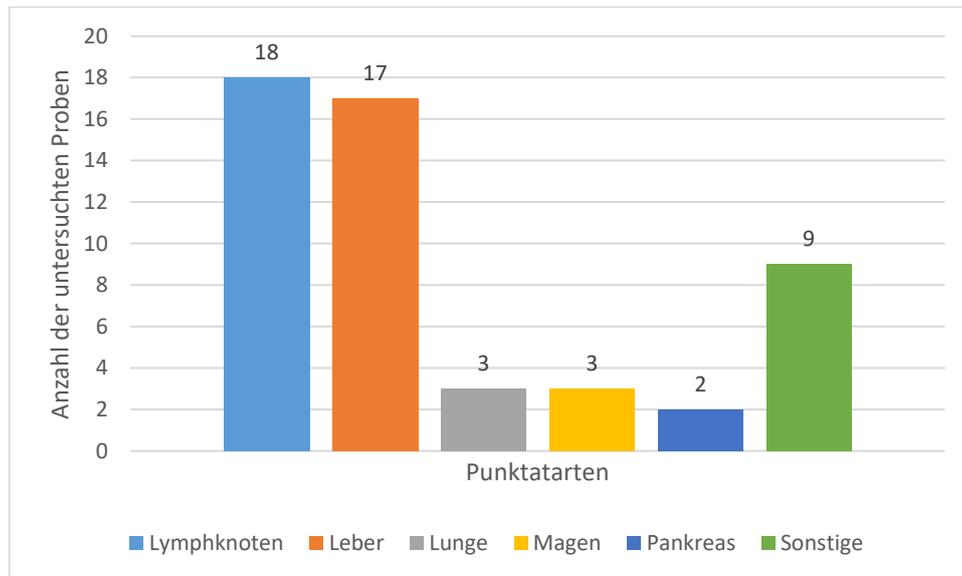


Abb. 26: Darstellung über die Anzahl der untersuchten Feinnadelpunktate diverser Lokalisationen bei Männern (n=52)

#### 3.4.3.1.1 Immunzytochemische Untersuchung zur Tumoridentifikation und Tumortypisierung – FNP

Bei den Feinnadelpunktaten ergeben sich schon allein aufgrund der Entnahme aus vielen verschiedenen Bereichen des Körpers, an denen man verschiedene Malignome erwartet, vielfältige Differentialdiagnosen, so dass sich hier eine recht individuelle Markerauswahl jenseits der Panel ergab. Deswegen wird im Folgenden auf eine detaillierte Darstellung der eingesetzten Antikörper verzichtet, da im Grunde nahezu jeder Fall eine individuelle immunzytochemische Untersuchung erhalten hat. Zur näheren Veranschaulichung werden in den jeweiligen Punktatklassen die genutzten Antikörper einiger Fälle beispielhaft erläutert.

### **Feinnadelpunktate der Lymphknoten (n=18):**

Insgesamt lagen 17 Proben mit sicheren oder möglichen epithelialen Infiltraten vor, in einem Fall ging es um eine lymphatische Erkrankung. In 15 Proben zeigte die konventionelle Zytologie ein „positives“ Ergebnis, während in 3 Proben ein „dringender Verdacht“ geäußert wurde.

Die Wahl der Antikörper wurde sehr variabel und individuell gestaltet. In einigen, wenigen Fällen kam das bekannte „klassische Markerpanel“ zur Tumorsuche, allerdings in der Kombination weiterer Antikörper, bei unklarem Zellbild zur Anwendung, während in der Mehrheit der Fälle, abhängig von der vorhandenen Probenmenge und von der klinischen Angabe früherer Tumoren bzw. eines konkreten Tumorverdachts sehr zielgerichtet Antikörper gewählt wurden.

Beispielsweise wurden in einem Fall bei vorbekanntem Prostatakarzinom und zu dem Zeitpunkt aktuell vorliegendem auffälligen paraaortalen Lymphknoten zunächst BerEP4 und CD45RO zur Tumorsicherung eingesetzt, später dann PSA und PSMA als für ein Prostatakarzinom typische Marker sowie Uroplakin (zur Abgrenzung gegenüber einem Urothelkarzinom). Das Ergebnis fiel zugunsten des vorbekannten Prostatakarzinoms aus.

In einem anderen Fall wurde bei nicht vorbekanntem Tumor und zu dem Zeitpunkt aktuell vorliegender auffälliger Raumforderung im Mediastinum wohl aufgrund der Zytomorphologie als einziger Antikörper TTF-1 eingesetzt. Das Färbeergebnis fiel „stark positiv“ aus, somit passend zu einem Adenokarzinom mit primärem Sitz in der Lunge.

Lediglich eine Probe bei klinisch bekanntem, bereits rezidierten folliculärem Non-Hodgkin-Lymphom und zytologisch „dringendem Verdacht“ zeigte immunzytochemisch keine wegweisende Reaktion für ein malignes Geschehen, so dass nach immunzytochemischer Aufarbeitung das Zellbild als „reaktiv“ und nicht tumorzellbestätigend eingestuft worden ist (siehe Tabelle 19).

Zytologischer Befund	Immunzytochemischer Befund				Resultat
	positiv	Dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ	
Positiv	15	-	-	-	<b>15</b>
Dringender Verdacht	2	-	-	1	<b>3</b>
Zweifelhaft	-	-	-	-	-
Negativ	-	-	-	-	-
<b>Resultat</b>	<b>17</b>	-	-	<b>1</b>	<b>18</b>

Tabelle 19: Datenübersicht der zytologischen und der immunzytochemischen Befunde zur Tumorentifikation bei der Lymphknoten-FNP; männliche Kohorte (n=18). Alle 17 abschließend positiven Fälle konnten darüber hinaus immunzytochemisch typisiert werden.

Durch Anwendung der Immunzytochemie konnte in allen 15 zytologisch positiven Fällen der Primärtumor identifiziert werden. Bei zwei der drei zytologisch „dringend verdächtigen“ Fälle konnte Tumorzellen abschließend gesichert und anschließend der Primärtumor ebenfalls typisiert werden. Im dritten Fall eines „dringenden Verdachtes“ ließen sich Tumorzellen immunzytochemisch nicht bestätigen, so dass der Fall auf „negativ“ zurückgestuft wurde.

#### **Feinnadelpunktate der Leber (n=17):**

Bei den Leber-FNP (n=17) zeigte die Auswertung der konventionellen Zytologie in 13 Proben ein „positives“, in 3 Proben ein „zweifelhaftes“ und in 1 Probe ein „negatives“ Ergebnis. Auch hier wurden die Antikörper sehr individuell gewählt. Beispielsweise wurde in einem Fall bei vorbekanntem CUP und zu dem Zeitpunkt vorliegenden Lebermetastasen lediglich CK7, CK20 und cdx2 eingesetzt mit dem Ergebnis „Zellen eines metastasierenden Kolonkarzinoms“ bei kräftiger positiver Färbereaktion für CK20 und cdx2, so dass offenbar die Morphologie bereits ein kolorektales Karzinom nahelegte. In einem anderen, zytologisch „zweifelhaften“ CUP-Fall wurden bei klinischem Verdacht auf Lebermetastasen die Antikörper BerEP4, HepPar1, CD68, Ki67 und CD31 eingesetzt, weil die Morphologie eher für ein HCC als für eine Metastase sprach. Das Färbergebnis ließ bei nur geringer Zellzahl abschließend einen „dringenden Verdacht“ auf ein gut differenziertes HCC zu.

Von den 3 zytologisch „zweifelhaften“ Befunden konnten 2 auf „dringenden Verdacht“ angehoben werden, während in einem Fall Tumorzellen gesichert werden konnten („positiv“) (Tabelle 20) und später auch typisiert werden konnten.

Konventionell-zytologischer Befund	Immunzytochemischer Befund				Resultat
	Positiv	Dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ	
Positiv	13	-	-	-	<b>13</b>
Dringender Verdacht	-	-	-	-	-
Zweifelhaft	1	2	-	-	<b>3</b>
Negativ	-	-	-	1	<b>1</b>
<b>Resultat</b>	<b>14</b>	<b>2</b>	-	<b>1</b>	<b>17</b>

Tabelle 20: Datenübersicht der konventionell-zytologischen und der immunzytochemischen Befunde zur Tumoridentifikation der Leber-FNP; männliche Kohorte (n=17). 12 Fälle konnten außerdem typisiert werden.

Zusammengefasst konnten in 12 der 16 nicht-negativen Proben ein Primarius typisiert werden. In 3 Fällen waren die immunzytochemischen Färbereaktionen nicht auswertbar, ein Fall blieb offen.

### **Feinnadelpunktate der Lunge, des Magens und des Pankreas (n=8):**

Die konventionelle Zytologie zeigte für alle 3 Lungen-, 2 der 3 Magen- und die beiden Pankreaspunktate jeweils ein Tumorzell-„positives“ Ergebnis; einer Magenwandprobe wurde als „zweifelhaft“ beurteilt (Tabelle 21). Während bei den Lungen- und Pankreaspunktaten in der Anamnese jeweils ein Tumor vorbekannt war, ging es bei den Magenpunktaten im Speziellen um die Frage nach GIST.

Bei den Lungenpunktaten konnten in 2 der 3 untersuchten Proben Zellen bereits bekannter Malignome, und zwar eines Urothelkarzinoms bzw. eines Plattenepithelkarzinom der Lunge, immunzytochemisch bestätigt werden; in der dritten Probe ergab sich kein wegweisendes Markerprofil. Zwei Magenproben waren klar c-kit- und CD34-positiv und wurden einem GIST zugeordnet; auch die dritte Probe wies in Richtung eines GIST, jedoch wurde hier bei „zweifelhafter“ Morphologie und geringer Reaktivität der Marker nur ein „dringender Verdacht“ geäußert. Bei den Pan-

kreasproben ergaben sich über eine BerEP4-Positivität Zellen eines nicht kleinzelligen Karzinoms, in einem Fall (bei bekanntem malignem Melanom) am ehesten einem Primärtumor der Leber zuzuordnen. Der zweite Fall blieb in der Typisierung offen; bei bekanntem Prostatakarzinom und morphologisch vermutetem neuroendokrinen Tumor blieben alle entsprechenden Marker negativ.

Zytologischer Befund	Immunzytochemischer Befund				Resultat
	positiv	Dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ	
Positiv	7	-	-	-	7
Dringender Verdacht	-	-	-	-	-
Zweifelhaft	-	1	-	-	1
Negativ	-	-	-	-	-
<b>Resultat</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>8</b>

Tabelle 21: Datenübersicht der konventionell-zytologischen und der immunzytochemischen Befunde zur Tumorentifikation und Lungen-, Magen- und Pankreaspunktate FNP; männliche Kohorte (n=8).

Insgesamt konnten 4 der 8 Fälle typisiert werden und 3 differentialdiagnostisch vorgebahnt werden; ein Karzinominfiltrat im Pankreas blieb offen.

#### **Feinnadelpunktate der Kategorie „Sonstige“ (n=9):**

In der Kategorie „Sonstige“ der Feinnadelpunktate wurden 2 Proben des Retroperitoneums und jeweils 1 Probe des Peritoneums, des Mediastinums, des Abdomens, des Musculus psoas, der Leiste, der Flanke und aus einem Wirbelkörper zusammengefasst (Tabelle 22). Die Zytologie zeigte mit Ausnahme eines „zweifelhaften“ Ergebnisses der Probe aus dem Psoas-Muskel jeweils ein „positives“ Ergebnis für Tumorzellen. Auch hier wurden bezogen auf die klinischen Angaben sehr individuelle Markerkonstellationen eingesetzt.

Es ergab sich in vier Fällen eine erfolgreiche Typisierung:

- in den Proben des Mediastinums sowie des Peritoneums Zellen eines malignen Mesothelioms (Antikörper-Panel BerEP4, Calretinin, EMA und WT-1),

- in einer der beiden Proben aus dem Retroperitoneum ein Plasmozytom-Infiltrat (bei CD138-Positivität),
- in der anderen Probe aus dem Retroperitoneum (bei klinischem Verdacht auf ein Lymphom) Tumorzellen eines Prostatakarzinoms (mit PSA- und PSMA-Positivität).

In der Probe aus dem Abdomen bei 10 cm großem Tumor wurde ein zytologisch nicht näher typisierbares Sarkom (mit Vimentin-Positivität und GFAP-, Aktin- und Anti-Myo-D1-Negativität) gesichert. Die übrigen Proben enthielten jeweils epithelial imponierende Tumorzellen, die aber nicht näher typisiert werden konnten. In der Probe aus der Leiste konnte bei klinischem Verdacht auf ein Bronchialkarzinom bzw. Mesotheliom bei Negativität gegen BerEP4, Calretinin und TTF-1 keine entsprechende Typisierung erfolgen; damit waren hier bei nur eingeschränkter Zellzahl die Möglichkeiten erschöpft. Ebenso war eine Tumortypisierung der Probe aus der Flanke bei vorbekanntem Prostatakarzinom nicht möglich, nachdem PSMA und TTF-1 negativ ausgefallen waren und keine weiteren Präparate mehr zur Verfügung standen. In dem Fall der Feinnadelpunktion aus einem Wirbelkörper (bei klinisch bekanntem Lymphom) zeigte die konventionelle Zytologie Zellen eines neuroendokrinen Tumors, die aber mit Synaptophysin und Chromogranin negativ waren. Eine ergänzende DNA-Zytometrie bestätigte hier aber die maligne Transformation der untersuchten Zellen. Die Probe aus dem Psoas-Muskel, welche klinisch als Abszess und zytologisch „zweifelhaft“ bewertet wurde, enthielt keine BerEP4-positiven Zellen, so dass keine epithelialen Tumorzellen nachgewiesen wurden.

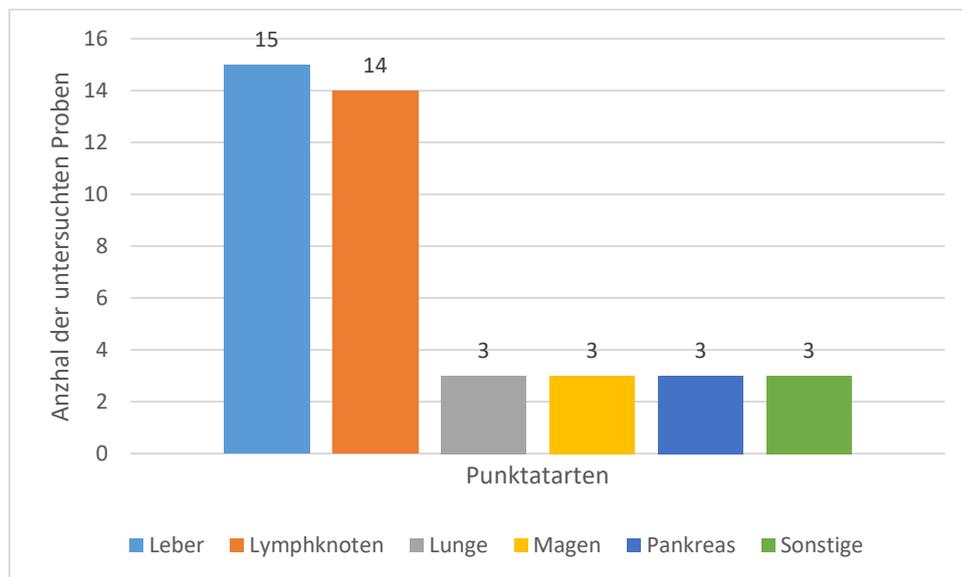
Zytologischer Befund	Immunzytochemischer Befund				Resultat
	positiv	Dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ	
Positiv	8	-	-	-	<b>8</b>
Dringender Verdacht	-	-	-	-	-
Zweifelhaft	-	-	1	.	<b>1</b>
Negativ	-	-	-	-	-
<b>Resultat</b>	<b>8</b>	-	<b>1</b>	-	<b>9</b>

Tabelle 22: Datenübersicht der konventionell-zytologischen und der immunzytochemischen Befunde zur Tumortypisierung der Kategorie „sonstigen Fälle“ der FNP, männliche Kohorte (n=9)

Zusammengefasst ließen sich 4 Fälle mit Hilfe der Immunzytochemie tumortypisierend klären (50%). In den übrigen vier Fällen, darunter ein Sarkom, gelang dieses nicht. In zwei Fällen lag es dabei daran, dass keine weiteren Präparate mehr für die Immunzytochemie zur Verfügung standen.

### 3.4.3.2 Auswertung der weiblichen Kohorte - FNP

Bei der Auswertung der weiblichen Kohorte (n=41) der FNP ergibt sich im Vergleich zu der männlichen Kohorte eine ähnliche Verteilung der eingesandten Proben (Abb. 27).



**Abb. 27:** Darstellung über die der Anzahl der untersuchten Feinnadelpunktate diverser Lokalisationen bei Frauen (n=41)

Im Einzelnen handelte es sich um 15 Leberpunktate, 14 Lymphknotenpunktate, jeweils 3 Lungen-, 3 Magen- sowie 3 Pankreaspunktate und 2 Punktate der Nebenniere sowie 1 Probe des Retroperitoneums.

#### Feinnadelpunktate der Leber (n=15)

Von den insgesamt 15 Leber FNP's zeigte die Zytologie in 14 Proben ein „positives“ Ergebnis für Tumorzellen, während eine Probe „zweifelhaft“ ausfiel (Tabelle 23).

Zytologischer Befund	Immunzytochemischer Befund				Resultat
	positiv	Dringender Verdacht	zweifelhaft	Negativ	
Positiv	14	-	-	-	14
Dringender Verdacht	-	-	-	-	-
Zweifelhaft	-	1	-	-	1
Negativ	-	-	-	-	-
<b>Resultat</b>	<b>14</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>15</b>

Tabelle 23: Datenübersicht der konventionell-zytologischen und der immunzytochemischen Befunde zur Tumoridentifikation der Leber-FNP; weibliche Kohorte (n=15).

Die Auswahl der immunzytochemischen Marker zur Typisierung wurde ebenso wie bei der männlichen Kohorte sehr variabel und individuell gewählt. In der Mehrzahl der Proben konnte mittels Immunzytochemie ein Primarius bestätigend typisiert werden (n=11), während in 3 Proben nach immunzytochemischer Aufarbeitung die Tumorzellen bei sicher positiver Mikroskopie nicht näher typisiert werden konnten. Hierbei handelte es sich in einer Probe um ein vorbekanntes CUP-Syndrom mit klinischem Verdacht auf eine Lebermetastase durch ein Kolonkarzinom. Der Marker cdx2 zeigte sich in den stark nekrotischen Tumorzellen negativ. In einer weiteren Probe bei klinisch bekanntem Ovarialkarzinom und chronischer Hepatitis wurde beispielsweise das klassische Markerpanel zur Tumortypisierung, ergänzt um HepPar-1, einem Antikörper zu Differenzierung von hepatischen Neoplasien, eingesetzt. Das Färbeergebnis blieb bei deutlich positiver Mikroskopie für alle Marker negativ, sodass auch hier keine Tumortypisierung gelang. In dem dritten Fall waren klinisch ein Mammakarzinom sowie ein malignes Melanom bekannt, entsprechend wurden die Marker Mammaglobin, ER, PR, HMB45 und Melan A zur differentialdiagnostischen Abklärung verwendet. Alle Marker zeigten keine Reaktion, sodass keine immunzytochemische Typisierung gelang und der Fall rein konventionell-zytologisch betrachtet als Absiedlung eines malignen Tumors, am ehesten passend zu Zellen einem malignen Melanom, abgeschlossen wurde.

Lediglich eine Probe bei klinischem Verdacht auf ein HCC und zweifelhafter Mikroskopie blieb nach Einsatz der Antikörper CD31 und Ki67 mit erhöhter proliferativer

Aktivität bei wenig nachweisbaren suspekten Zellen mit „dringendem Verdacht“ auf Tumorzellen zwar unklar, wurde aber in ihrer Aussagekraft zumindest verdichtet.

Insgesamt ließen sich 11 der 14 Tumordinfiltrate typisieren (78,6%) und im „dringend verdächtigen“ Fall der Tumortyp (HCC) vermuten. Drei Tumorfälle blieben offen.

### **Feinnadelpunktate der Lymphknoten (n=14)**

Bei den FNP der Lymphknoten diverser Lokalisationen zeigte die konventionelle Zytologie in 12 Proben ein positives Ergebnis für Tumorzellen, 2 Proben zeigten sich zweifelhaft (Tabelle 24).

Konventionell- zytologischer Befund	Immunzytochemischer Befund				Resultat
	Positiv	Dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ	
Positiv	12	-	-	-	<b>12</b>
Dringender Verdacht	-	-	-	-	-
Zweifelhaft	-	-	1	1	<b>2</b>
Negativ	-	-	-	-	-
<b>Resultat</b>	<b>12</b>	-	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>14</b>

Tabelle 24: Datenübersicht der konventionell-zytologischen und der immunzytochemischen Befunde zur Tumorentifikation der Lymphknoten FNP; weibliche Kohorte (n=14)

In 9 der 12 positiven Proben konnten nach Auswertung der immunzytochemischen Färbereaktion ein Primarius zugeordnet werden (64,3%), während in 3 Proben mit positiver und 2 Proben mit zweifelhafter Mikroskopie die Immunfärbungen negativ ausfielen und somit keine Typisierung gelang. In einer der „zweifelhaften“ Proben ergab sich anschließend DNA-bildzytometrisch keine DNA-Aneuploidie nachgewiesen und somit keine maligne Transformation dargestellt („negativ“).

### **Feinnadelpunktate der Lunge, des Magens und des Pankreas (n=9)**

Die konventionelle Zytologie zeigte in 7 Proben ein positives Ergebnis, ein Fall war zweifelhaft, ein weiterer (aus dem Pankreas) zytologisch negativ (Tabelle 25).

Zytologischer Befund	Immunzytochemischer Befund				Resultat
	positiv	Dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ	
Positiv	7	-	-	-	<b>7</b>
Dringender Verdacht	-	-	-	-	-
Zweifelhaft	-	-	-	1	<b>1</b>
Negativ	-	-	-	1	<b>1</b>
<b>Resultat</b>	<b>7</b>	-	-	<b>2</b>	<b>9</b>

Tabelle 25: Datenübersicht der konventionell-zytologischen und der immunzytochemischen Befunde zur Tumoridentifikation der Lungen-, Magen- und Pankreaspunktate FNP; weibliche Kohorte (n=9)

Bei den 3 Lungenproben war in der Anamnese jeweils ein Tumor, davon ein Kolonkarzinom und 2 Mammakarzinome, vorbekannt. Bei der Patientin mit bekanntem Kolonkarzinom wurde ein Adenokarzinom der Lunge diagnostiziert (positiv: CK7, TTF-1; negativ: CK20, cdx-2), bei einer der beiden Patientinnen mit bekanntem Mammakarzinom bestätigte sich eine entsprechende Metastase (Mammaglobin positiv, TTF-1 negativ). Der andere Fall blieb vom Tumortyp her offen, da Mamma- und Lungenmarker negativ waren.

Bei den Pankreasproben wurde der einzige zytologisch „positive“ Fall bei positiver Immunfärbung für Alpha-1-Antichymotrypsin und Anti-Alpha-1-Trypsin und negativer Färbereaktion für cdx2 einem primären Pankreaskarzinom zugeordnet. Bei einem zytologisch „zweifelhaften“ Befund zeigte sich eine suspekta Lymphozytenpopulation, die in der B- und T-Zell-Immunzytochemie ein heterogenes Bild zeigte, das als reaktives Zellbild und somit „negativ“ interpretiert wurde. Der dritte Fall wurde trotz zytologischer Negativität auf klinischen Wunsch weiter untersucht, weil eine suspekta zystische Raumforderung Das Ergebnis der CEA-Immunzytochemie war negativ, so dass sich auch immunzytochemisch kein Hinweis auf maligne Tumorzellen ergab.

Bei den drei Magenproben bestand klinischerseits die Frage nach einem GIST, in einem Fall war ein GIST bereits vorbekannt. In 2 der 3 Proben konnte mittels c-kit- und CD34-Positivität ein GIST bestätigt werden, im dritten Fall waren diese Marker

negativ, hingegen Aktin positiv, so dass Zellen eines Leiomyoms diagnostiziert wurden.

Zusammenfassend konnte somit in 6 der 7 positiven Fälle (85,7%) eine Tumortypisierung erfolgen, ein Fall blieb offen; zwei Fälle erwiesen sich als tumorfrei.

### **Feinnadelpunktate der Kategorie „Sonstige“ (n=3)**

Von den Proben, welche hier unter „Sonstige“ zusammengefasst sind, stammte eine aus dem Peritoneum und 2 aus den Nebennieren. Alle 3 Proben zeigten eine positive Mikroskopie für Tumorzellen (Tabelle 26).

Zytologischer Befund	Immunzytochemischer Befund				Resultat
	positiv	Dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ	
Positiv	3	-	-	-	<b>3</b>
Dringender Verdacht	-	-	-	-	-
Zweifelhaft	-	-	-	-	
Negativ	-	-	-	-	-
<b>Resultat</b>	<b>3</b>	-	-	-	<b>3</b>

Tabelle 26: Datenübersicht der konventionell-zytologischen und der immunzytochemischen Befunde zur Tumoridentifikation der „sonstigen“ Fälle, weibliche Kohorte (n=3)

Bei der Probe des Peritoneums war ein Kolon- sowie Ovarialkarzinom vorbekannt. Es wurde in dem Fall das klassische Markerpanel bei unklaren Ergüssen eingesetzt. Letztlich konnten Zellen des bekannten Ovarialkarzinoms bei immunzytochemischer Expression für CA125 und CK7 bestätigt werden. Bei den 2 Proben der Nebenniere war in einem Fall ein Mammakarzinom vorbekannt. Bei positiver Mikroskopie konnte in beiden Fällen bei nur sehr wenig Zellmaterial mit Hilfe der Immunzytochemie keine Tumorzelltypisierung vorgenommen werden. Entsprechend betrug der Anteil typisierter Fälle hier 33,3%.

### **3.4.3.3 Zusammenfassender Überblick der Resultate der immunzytochemischen Untersuchung der Feinnadelpunktate**

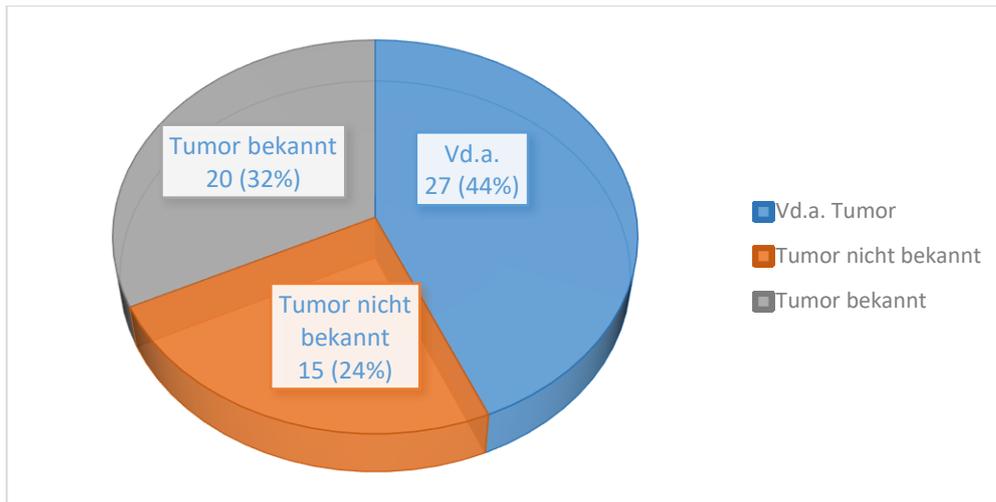
Die Auswertung der Feinnadelpunktate ist im Vergleich zu den anderen Proben sicherlich als eine besondere Kategorie anzusehen, da hier der Ort der Probenentnahmen nicht nur einer Region entspricht, sondern Punktate verschiedenster Lokalisationen untersucht wurden. Da entsprechend auch sehr breit gestreute Fragestellung und Tumoranamnesen existierten, wurde der Einsatz der Immunzytochemie hier weniger nach Panel-Vorgaben vorgenommen, sondern wurde sehr individuell gewählt.

Zusammengefasst konnten in den insgesamt 85 nach Morphologie und Immunzytochemie „positiven“ Proben 64 (75,3%) immunzytochemisch tumortypisiert werden; in drei weiteren Fällen (Lymphknotenpunktate Männer) konnten differentialdiagnostische Eingrenzungen angeboten werden; nähme man diese Fälle hinzu, dann wäre eine teilweise oder vollständige Typisierung in 78,8% der Fälle gelungen. In 18 Fällen war eine Typisierung nicht möglich, dabei aus technischen Gründen (zu wenige Präparate) in 7 Fällen (8,2% von 85) und aus inhaltlichen Gründen (nicht diagnostisches Markerprofil) in 11 Fällen (12,9% von 85).

### **3.4.4 Auswertung der Aszitespunktaten**

Insgesamt waren von den 376 untersuchten Fällen 62 Aszitespunktaten (16%). Hierbei handelt es sich um 21 Patienten (21%) und 41 Patientinnen (79%). Nach klinischer Angabe war in 20 Fällen (32%) bereits ein Tumor vorbekannt, in 15 Fällen (24%) war kein Tumor vorbekannt, und in 27 Fällen (44%) bestand klinischerseits ein Tumorverdacht (Abb. 28).

Im Folgenden werden die Daten zu den Aszitespunktaten sortiert nach Geschlecht und Indikation der immunzytochemischen Untersuchung detailliert dargestellt.



**Abb.28:** Übersicht der prozentualen Verteilung der 62 Aszitespunktaten für Männer und Frauen in die Kategorien: „Tumor vorbekannt“, „nicht vorbekannt“ und „Verdacht auf Tumor“

### 3.4.4.1 Immunzytochemische Untersuchung zur Tumoridentifikation – Aszitespunktate bei Männern

Unter den 21 Patienten befanden sich 11 zytologisch als „positiv“ beurteilte Proben, ferner 4 als „dringend verdächtig“ und 6 als „zweifelhaft“ eingestufte Proben. Zur Tumoridentifikation bzw. zu dessen Ausschluss wurden an diesen 10 Fällen als diagnostische immunzytochemische Marker BerEP4 und HEA125 eingesetzt. In einem der „zweifelhaft“ deklarierten Befunde wurde bei klinisch vorbekanntem Prostatakarzinom der Marker PSA und PSMA ergänzend eingesetzt. Einen Überblick der Datenverteilung gibt Tabelle 27:

Zytologischer Befund	Immunzytochemischer Befund				Resultat
	Positiv	dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ	
Positiv	-	-	-	-	-
dringender Verdacht	3	-	-	1	<b>4</b>
Zweifelhaft	3	2	-	1	<b>6</b>
Negativ	-	-	-	-	<b>0</b>
<b>Resultat</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>10</b>

**Tabelle 27:** Datenübersicht der konventionell-zytologischen und der immunzytochemischen Befunde zur Tumoridentifikation der Aszitespunktate; männliche Kohorte (n=10)

Somit konnten in 6 von 10 zytologisch nicht eindeutigen Proben immunzytochemisch Tumorzellen identifiziert und in 2 weiteren Proben Tumorzellen ausgeschlossen werden (Klärungsquote 80%). In 2 „zweifelhaften“ Proben wurden nicht in ausreichendem Maße immunzytochemische Kriterien für manifeste Tumorzellen erfüllt, so dass die Diagnostik nur mit einem „dringenden Verdacht“ auf Tumorzellen bei nur wenig vorliegenden und immunzytochemisch positiv markierten Zellen abgeschlossen werden konnte. Insgesamt wurden somit 90% der zytologischen Kategorien verändert. Für Typisierungsuntersuchungen lagen in allen 10 Fällen zu wenige Zellen vor. Die zytologische Untersuchung einer Wiederholungspunktion bei einem der beiden Patienten ergab einen tumorfreien Stauungserguss.

#### **3.4.4.2 Immunzytochemische Auswertung zur Typisierung epithelialer Tumoren – Aszitespunkate bei Männern**

Bei 11 der insgesamt 21 männlichen Patienten konnten bereits mittels konventioneller Zytologie Tumorzellen bestätigt werden, sodass hier das immunzytochemische Markerpanel zur Tumortypisierung (CK7, CK5/6, CK20, cdx2, TTF-1) eingesetzt wurde. In 7 der 11 Proben konnte mit dem klassischen Markerpanel eine genaue Primariuszuordnung getroffen werden, eine Zusammenfassung über die Entitäten findet sich im unten in Kapitel 3.4.4.5.

In 3 der 11 Proben wurden ergänzende Marker eingesetzt. Hierbei wurde in einem Fall bei klinischem Verdacht auf ein Malignom der Niere der Marker RCC hinzugekommen (positiv), wodurch eine Peritonealkarzinose durch ein Nierenzellkarzinom immunzytochemisch bestätigt werden konnte. In einem weiteren Fall bei vorliegendem CUP-Syndrom wurden zur differentialdiagnostischen Abgrenzung zwischen einem Lymphom LCA und CD138 (jeweils negativ) und einem malignen Melanom Melan A und HMB45 (jeweils positiv) angewandt, so dass ein malignes Melanom vorlag. In einem dritten Fall konnte ein malignes Mesotheliom bei durch das entsprechende Antikörperpanel (BerEP4, Calretinin, EMA, WT1) identifiziert werden. In einem weiteren Fall wurden vor dem Hintergrund einer Zweitmeinung bereits konventionell und immunzytochemisch gefärbte Präparate eingesandt, an denen Tumorzellen eines Karzinoms bestätigt werden konnten; die auswärts gewählten Marker CEA und TPA waren aber für die Zuordnung zu einem Urothelkarzinom nicht geeignet.

Im Folgenden gibt die Tabelle 28 einen Überblick über die 4 Fälle und der immunzytochemischen Auswertung sowie den abschließenden Diagnosen unter Berücksichtigung der ergänzend eingesetzten Antikörper. Fall 4 zeigt hierbei den Sonderfall. Das Markerpanel zur Tumortypisierung wird, wie zuvor als „P1“ gekennzeichnet.

Fall	Tumor vorbekannt?	Konventionelle Zytologie	Immunzytochemische Marker	Ergebnis
1	Verdacht auf Karzinose bei Nierenzysten	Positiv	P1 + RCC (+)	Peritonealkarzinose bei Nierenzellkarzinom
2	Hepatische Rundherde bei CUP	Positiv	P1 + MelanA (+), HMB45 (+)	Peritonealinfiltrat durch ein malignes Melanom
3	Verdacht auf Mesotheliom	Positiv	P1 + BerEP4 (-), EMA (+), Calretinin (+), WT-1 (+)	Tumorzellen eines malignen Mesothelioms
4	Sonderfall – Zweitmeinung:  Externe Diagnose: Urothel-Ca der Harnblase	Positiv	CEA (-) TPA (-)	Morphologisch und immunzytochemisch eher ein Adenokarzinom (G2) anderer Lokalisation; kein Urothelkarzinom

Tabelle 28: Übersicht über die Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchung unter Berücksichtigung ergänzend eingesetzter Marker bei der Tumortypisierung; männliche Kohorte der Aszitespunkate (n=4); (+) = immunzytochemisch positiv, (-) immunzytochemisch negativ

Zusammengefasst konnten alle 10 aus dem eigenen Eingang stammenden „positiven“ Aszitesproben von Männern mittels der Immunzytochemie tumortypisiert werden. Ob dieses auch bei dem externen Fall möglich gewesen wäre, zu dem keine eigenen Marker anwendbar waren, muss offenbleiben.

### 3.4.4.3. Immunzytochemische Untersuchungen zur Tumoridentifikation – Aszitespunkate bei Frauen

Bei den 41 Patientinnen lagen 32 „positive“ Proben vor, ferner 9 Proben, bei denen Tumorzellen zytologisch nicht eindeutig erkannt bzw. ausgeschlossen werden konnte. Die Zytologie ergab hier 2 „dringend verdächtige“ und 7 „zweifelhafte Befunde“, sodass auch hier zur Tumoridentifikation die Marker BerEP4 und HEA125 eingesetzt wurden. In jeweils einem Fall war aber bei nur sehr wenig vorliegendem Zellmaterial nur die Anwendung eines der beiden Marker (in einem Fall BerEP4, im anderen Fall HEA125) möglich gewesen (Tabelle 29).

Zytologischer Befund	Immunzytochemischer Befund				Resultat
	positiv	dringender Verdacht	zweifelhaft	negativ	
positiv	-	-	-	-	<b>0</b>
dringender Verdacht	2	-	-	-	<b>2</b>
zweifelhaft	2	1	1	3	<b>7</b>
negativ	-	-	-	-	<b>0</b>
<b>Resultat</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>9</b>

Tabelle 29: Datenübersicht der konventionell-zytologischen und der immunzytochemischen Befunde zur Tumoridentifikation der Aszitespunkate; weibliche Kohorte (n=9)

Somit konnten in jeweils zwei konventionell-zytologisch zuvor dringend verdächtig oder zweifelhaften Befunden Karzinomzellen abschließend identifiziert werden. Hingegen wurden in 3 zuvor zweifelhafte Proben keine Karzinomzellen gefunden. In einer Probe bei klinisch bekanntem Mammakarzinom und der Bitte um Zweitmeinung fiel die immunzytochemische Reaktion mit dem Antikörper HEA125 unspezifisch aus, sodass der Befund „zweifelhaft“ blieb und eine Wiederholung empfohlen wurde. In einer weiteren, als „zweifelhaft“ beurteilten Probe wurde nach der Immunzytochemie aufgrund zu geringer Zahl von auffälligen Zellen die Diagnose zwar auf „dringender Verdacht“ verändert, ein eindeutiger Tumorzellnachweis im Sinne einer „positiven“ Diagnose gelang aber nicht. Insgesamt wurden 8 der 9 zytologischen Einstufungen (88,9%) verändert.

### 3.4.4.4 Immunzytochemische Auswertung zur Typisierung epithelialer Tumoren – Aszitespunkate bei Frauen

Bei den Frauen lagen 32 „positive“ Proben vor, an denen mit dem klassischen Markerpanel zur Tumortypisierung für Frauen weiter untersucht wurde (siehe im Detail Kapitel 3.4.4.5). In 4 Proben wurden zudem folgende ergänzende Marker eingesetzt: in 2 Fällen kamen bei Verdacht auf ein Pankreaskarzinom die Antikörper Alpha-1-Antitrypsin und Alpha-1-Antichymotrypsin zur Anwendung. In einem weiteren Fall bei Z.n. Mammakarzinom wurde als ergänzender Marker Mammaglobin eingesetzt und in einem letzten Fall bei V.a. Peritonealkarzinose wurde im Hinblick auf ein mögliches Nierenzellkarzinom neben dem Antikörper RCC zusätzlich Vimentin eingesetzt. Die Tabelle 30 gibt einen Überblick über die wesentlichen klinischen und morphologischen sowie immunzytochemischen Befunde dieser 4 Fälle.

Fall	Tumor vorbekannt?	Konventionelle Zytologie	Immunzytochemische Marker	Ergebnis
1	V.a. Pankreas- oder Ovarialkarzinom bei Peritonealkarzinose	Positiv	P1 + Anti-alpha1-Trypsin (+) + Alpha-1-Antichymotrypsin (+)	Zellen eines metastasierten Pankreaskarzinoms
2	Z.n. Mammakarzinom; RF im Becken	Positiv	P1 + Mammaglobin (-) bei CA125 (+)	Zellen eines metastasierten Ovarialkarzinoms
3	Verdacht auf Peritonealkarzinose	Positiv	P1 + RCC (-) + Vimentin (-), bei CA125 (+)	Zellen eines metastasierten Ovarial-, DD Magen-/Pankreas-Ca.
4	V.a. Pankreaskarzinom	Positiv	P1 +Anti-alpha1-Trypsin (+) + Alpha-1-Antichymotrypsin (+)	Zellen eines metastasierten Pankreas- DD Ovarialkarzinoms

**Tabelle 30:** Übersicht über die Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchung unter Berücksichtigung ergänzend eingesetzter Marker bei der Tumortypisierung; weibliche Kohorte der Aszitespunkate (n=4); (+) = immunzytochemisch positiv, (-) immunzytochemisch negativ

In 30 der 32 Proben (93,8%) konnte ein Primarius immunzytochemisch typisiert werden. In den Fällen 3 und 4 der Tabelle 31 konnte der Primärtumor immerhin differentialdiagnostisch eingegrenzt werden.

#### **3.4.4.5 Zusammenfassender Überblick der Resultate der immunzytochemischen Untersuchung der Aszitespunktate – männliche und weibliche Kohorte**

Insgesamt wurden geschlechterübergreifend im Untersuchungszeitraum 62 Aszitespunktate immunzytochemisch untersucht, bei denen zusammenfassend folgende Ergebnisse hinsichtlich der Tumoridentifikation und Tumortypisierung immunzytochemisch erzielt wurden:

##### **Identifikation epithelialer Tumorzellen (n = 19)**

Von den 19 Fällen, die zytologisch als „dringender Verdacht“ oder „zweifelhaft“ eingeordnet wurden, verblieb nur einer nach der ergänzenden Immunzytochemie in seiner Kategorie:

Von den 6 „dringend verdächtigen“ Aszitespunktaten wurden 5 als „positiv“ interpretiert, einer wurde als „negativ“ eingeordnet.

Bei den 13 „zweifelhaften“ Fällen wurden in fünf Fällen Tumorzellen gefunden („positiv“) und drei Fälle als „dringend verdächtig“ abgeschlossen. Die übrigen 4 Fälle wurden als „negativ“ für Tumorzellen beurteilt.

Die Immunzytochemie war somit in 18 der 19 Fälle diagnostisch wegweisend (94,7%) und trug hier essentiell zur morphologischen Diagnostik bei.

##### **Typisierung epithelialer Tumoren (n = 43)**

Die Ergebnisse der Tumortypisierung der 43 Fälle lassen sich wie folgt über beide Geschlechter zusammenfassen:

In 34 Fällen (79,1%) ließ sich ein Primärtumor sicher zuordnen:

- 21 Fälle (48,8% insgesamt; 65,6% der Fälle von Frauen) wurden als Peritonealkarzinosen eines Ovarialkarzinoms identifiziert,

- 6 Fälle waren den Karzinomen des Oberbauches (Magen / Pankreas) zuzuordnen
- 2 Fälle entstammten einem Lungenkarzinom,
- 2 weitere einem kolorektalen Karzinom.
- In jeweils einem Fall lagen ein Nierenzellkarzinom bzw. ein malignes Mesotheliom oder ein malignes Melanom vor; die letzteren beiden werden wegen des Einzelfallcharakters hier unter den epithelialen Tumoren belassen, obwohl sie nicht-epithelialer Genese sind.

In weiteren 8 Fällen (18,6%) waren wesentliche differentialdiagnostische Eingrenzungen möglich:

- Bei 3 Fällen wurde eine Herkunft aus der Lunge oder dem Ovar diskutiert,
- in 2 Fällen kamen ein kolorektales Karzinom oder ein Ovarialkarzinom in Betracht,
- in weiteren 2 Fällen ein Pankreaskarzinom oder ein Ovarialkarzinom und
- in einem Fall ein Primärtumor in der Lunge oder im Oberbauch.

Nur der Konsilfall (2,3%) blieb (aus methodischen Gründen) offen, an ihm konnten, wie oben in Kapitel 3.4.4.2 erwähnt, keine eigenen Marker mehr angewandt werden, und die auswärtige Diagnose erschien nicht plausibel.

### **3.4.5 Auswertung der Douglaspunktate**

Im Folgenden sollen die vier Douglaspunktate (1,1% der 376 Fälle) im Anschluss an die Aszitespunktate kurz besprochen werden. Sie stammen im Grunde ebenfalls aus dem Peritoneum, stellen also auch im weiteren Sinne Aszites dar und betreffen in der Regel ganz ähnliche Erkrankungen.

#### **3.4.5.1 Immunzytochemische Untersuchungen zur Tumorentifikation - Douglaspunktate**

In drei Fällen zeigte die konventionelle Zytologie einen „zweifelhaften“ Befund, so dass das Markerpanel zur Tumorentifikation (BerEP4, HEA125) eingesetzt wurde.

Dabei wurden in einer Probe bei Vorliegen eines Borderline-Tumors des Ovars Tumorzellen nachgewiesen („positiv“). In einer zweiten Probe ergab sich bei nur sehr geringer Zahl auffälliger Zellen ein „dringender Verdacht“ auf Tumorzellen, so dass bei dieser Patientin, bei der ein Mammakarzinom bekannt war und bei der klinisch eine Peritonealkarzinose angenommen wurde, kein eindeutiger Tumornachweis gelang. Eine erneute Punktion wurde nicht vorgenommen. Die Probe der dritten Patientin wies keine Tumorzellen auf und war somit nach Immunzytochemie „negativ“.

#### **3.4.5.2 Immunzytochemische Untersuchungen zur Tumortypisierung - Douglaspunktate**

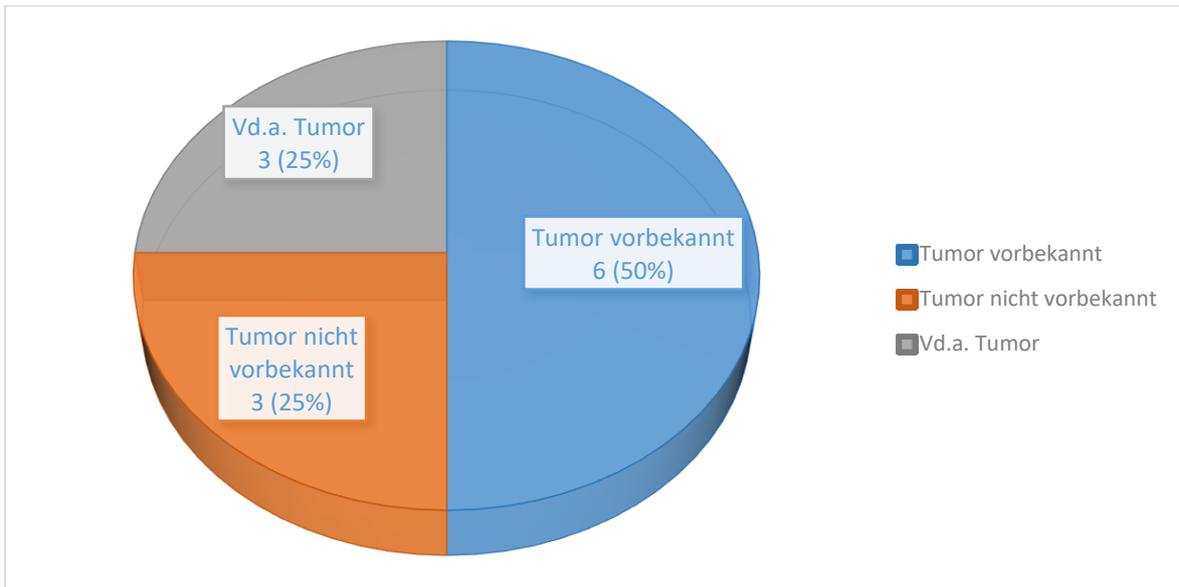
Bei der vierten Patientin zeigte die konventionelle Zytologie ein positives Ergebnis, sodass das klassische Markerpanel zur Tumortypisierung, ergänzt um CA125, Anwendung fand. Dabei konnte der klinische Verdacht eines Ovarialkarzinoms immunzytochemisch bestätigt werden.

#### **3.4.5.3 Zusammenfassender Überblick der Douglaspunktate**

An allen drei Proben mit zweifelhafter konventioneller Zytologie ergab sich immunzytochemisch eine diagnostische Neubewertung (jeweils einmal positiv, dringender Verdacht bzw. negativ). In einem einzigen „positiven“ Fall war die immunzytochemische Tumortypisierung erfolgreich.

#### **3.4.6 Auswertung der bronchoalveolären Lavagen (BAL)**

In dem vorliegenden Untersuchungsgut (n=376) wurden 12 (3%) bronchoalveoläre Lavagen immunzytochemisch untersucht. Hierbei handelte es sich um Proben von acht (67%) Männern und vier (33%) Frauen. In sechs Fällen (50%) war ein Tumor vorbekannt, in drei Fällen (25%) war kein Tumor vorbekannt. In drei weiteren Fällen (25%) ohne Tumoranamnese bestand eine klinische Verdachtsdiagnose auf ein Malignom (Abb. 29):



**Abb. 29:** Übersicht der prozentualen Verteilung der 12 BAL für Männer und Frauen in die Kategorien: „Tumor vorbekannt“, „nicht vorbekannt“ und „Verdacht auf Tumor“

Der Einsatz bzw. die Auswahl der immunzytochemischen Marker wurde in diesem Probengut, abhängig von den klinischen Angaben, nicht nur von dem Ergebnis der konventionellen Zytologie, sondern auch vor allem in Abhängigkeit der zur Verfügung stehenden Probenmenge (ausreichende Zellzahl, ausreichende Präparatezahl) individuell und gezielt gewählt. Diese abweichende Vorgehensweise liegt auch daran, dass es in den allermeisten Fällen um die Beurteilung dargestellten Epithelzellen ging, so dass das übliche Panel zur Detektion epithelialer Tumorzellen (BerEP4, HEA125) hier keinen Sinn machte.

### 3.4.6.1 Immunzytochemische Untersuchungen zur Tumoridentifikation - BAL

Drei der 12 Proben, allesamt von Männern, waren konventionell zytologisch negativ (Fälle 1 -3 in Tabelle 32), wurden aber bei bestehendem Tumorverdacht und bei häufig sehr geringem Zellgehalt speziell immunzytochemisch weiter untersucht. Bei einer Frau (Fall 4 in Tabelle 32) bestand eine zweifelhafte Zytologie bezogen auf epithelial differenzierte Zellen, während bei einer weiteren Frau (Fall 5) bei lediglich 2 abnormen Zellen konventionell-zytologisch der Zweifel auf einen Morbus Hodgkin geäußert wurde. Einen Überblick über Befunde der konventionellen Zytologie, der immunzytochemischen Auswertung und des Endergebnisses gibt Tabelle 31:

Fall	Tumor vorbekannt?	Konventionelle Zytologie	Immunzytochemische Marker	Ergebnis
1	Nein, V.a. Bronchialkarzinom (Gutachten)	negativ	EGP-2 (schwach+), TPA (+ in Bronchialschleimhaut)	Regelmäßige Bronchialschleimhaut mit geringer entzündlicher Komponente.
2	Nein V.a. Langerhanszell-Histiozytose	negativ	CD1a (-), S-100 (-)	Keine Langerhanszell-Histiozytose
3	Nein V.a. Langerhanszell-Histiozytose	negativ	CD1a (-)	Keine Langerhanszell-Histiozytose
4	Nein Computertomographisch diffuse Infiltrationen in der Lunge mit Verdrängung der Bronchien; Klinisch Frage nach Adenokarzinom	zweifelhaft	CK7 (+), CK10 (-)	Konventionell-zytologisch verdächtig auf Zellen eines Plattenepithelkarzinoms.  Immunzytochemisch Zellen eines Adenokarzinoms
5	Ja, M. Hodgkin	zweifelhaft (bei sehr geringer Zellzahl)	CD30 (-)	Kein Nachweis eines Morbus Hodgkins; eher eitriges Sekret.
6	Nein, Verdacht auf kleinzelliges Bronchialkarzinom	Dringender Verdacht	CD56 (-)	Zellen eines kleinzelligen Karzinoms nicht mit erforderlicher Sicherheit bestätigt; Verdacht bleibt bestehen

**Tabelle 31:** Kurzdarstellung der Ergebnisse der zytologisch und immunhistochemisch untersuchten BAL-Proben zur Tumoridentifikation. (+) = positive immunzytochemische Reaktion, (-) = negative immunzytochemische Reaktion; n=6

Fall 1 war der in Material und Methoden genannte Konsilfall, der sich auch immunzytochemisch als negativ erwies. In den Fällen 2 und 3 konnte der Verdacht auf eine Langerhanszell-Histiozytose nicht erhärtet werden; im vierten Fall wurden die fraglichen Tumorzellen abschließend als Zellen eines Adenokarzinoms interpretiert und in erster Linie einem Primärtumor der Lunge zugeordnet. Fall 5 wurde nach der immunzytochemischen Untersuchung abschließend als negativ abgeschlossen. Fall 6 wurde in seiner Wertung als „dringend verdächtig“ nicht verändert, auch wenn sich immunzytochemisch bei CD56-Negativität Zellen eines (kleinzellig-)neuroendokrinen Karzinoms nicht beweisen ließen.

Die relativ spärliche Wahl von Markern (im Vergleich zu den bei Ergussflüssigkeiten verwendeten Panels) ist Folge der begrenzten Zahl in der BAL nachweisbarer verdächtiger Zellen bzw. Zellgruppen, durch die die Palette anwendbarer Marker beschränkt wurde.

### 3.4.6.2 Immunzytochemische Untersuchungen zur Tumortypisierung - BAL

Bei sechs Fällen wurde zytologisch ein positiver oder und bei einem ein dringend verdächtiger Befund erstellt. Davon stammten vier Proben von Männern (Fälle 1 - 4 in Tabelle 33), drei von Frauen (Fälle 5 - 7 in Tabelle 32).

Fall	Tumor vorbekannt?	Konventionelle Zytologie	Immunzytochemische Marker	Ergebnis
1	Ja, malignes Melanom  Verdacht auf Bronchialkarzinom	Positiv	BerEP4 (+), HMB45 (-)	Zellen eines Bronchialkarzinoms, keine Melanom-Metastase
2	Ja, Carcinoma in situ (CIS) der Lunge	Positiv	CK7 (+), CK10 (-)	Zellen eines Adenokarzinoms der Lunge
3	Nein,  Verdacht auf Bronchialkarzinom	Positiv	CD56 (+), Synaptophysin (+), Chromogranin A (-)	Zellen eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms

4	Nein	Positiv	CK7 (+), CK10 (-)	Zellen eines Adenokarzinoms, ausgehend vom Bronchialsystem
5	Ja, Mammakarzinom, Verdacht auf Bronchialkarzinom	Positiv	Östrogen (-), Progesteron (-), Mammaglobin (-), TTF-1 (-)	Keine differentialdiagnostische Abgrenzung zwischen Mamma- und Bronchialkarzinom möglich
6	Ja, Bronchialkarzinom	Positiv	CD56 (-), Chromogranin (-)	Kein Nachweis eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms bei fehlender Immunreaktion; keine Typisierung möglich

Tabelle 32: Kurzdarstellung der Ergebnisse der konventionell-zytologisch und immunhistochemisch zur Tumortypisierung untersuchten sieben BAL-Proben unter Berücksichtigung der klinischen Angaben. (+) = positive immunzytochemische Reaktion, (-) = negative immunzytochemische Reaktion

Bei Fall 1 konnte die Differentialdiagnose Melanom vs. Bronchialkarzinom zugunsten des Bronchialkarzinoms gelöst werden. Auch in den Fällen 2 - 4 konnten die Tumorzellen einem Bronchialkarzinom zugeordnet werden, und zwar zweimal einem Adenokarzinom und einmal einem kleinzelligen Karzinom. Dabei war bei Fall 4 bei nur wenigen Präparaten mit Tumorzellen keine TTF1-Immunzytochemie möglich, und die Zuordnung zu einem Lungenkarzinom erfolgte morphologisch. In den Fällen 5 und 6 blieb es bei Karzinomzellen, an denen aber keine Subtypisierung im Sinne der Fragestellungen gelang.

### **3.4.6.3 Zusammenfassender Überblick der Resultate der immunzytochemischen Untersuchung der BAL**

Somit konnten in dem Untersuchungsgut der BAL im Hinblick auf die Identifikation von Tumorzellen mit Hilfe der Immunzytochemie drei zytologisch negative Diagnosen untermauert und damit abschließend gesichert werden. In einem zweifelhaften Fall führte die Immunzytochemie zur Identifikation von Tumorzellen und somit zu

einer positiven Enddiagnose. In einem weiteren Fall einer zweifelhaften zytologischen Diagnose mit zwei auffälligen Zellen konnte ein Verdacht auf eine Lungenbeteiligung bei bekanntem nicht untermauert werden. Ein Fall eines dringenden Verdachtes auf ein kleinzellig-neuroendokrines Lungenkarzinom (SCLC) konnte nicht weiter geklärt werden, so dass die Diagnose eines dringenden Tumorverdachtes blieb.

Von den sechs zytologisch positiven Fällen konnten 4 immunzytochemisch einem Primärtumor zugeordnet werden; in zwei Fällen war eine nähere Typisierung bei nur sehr geringer Tumorzellzahl und negativem Ausfall der Immunreaktionen nicht möglich.

### **3.4.7 Auswertung der Liquorpunktate**

Fünf der 376 Proben waren Liquorpunktate (1,3%). Eine Probe stammte von einem Mann mit einer im selben Jahr kurz zuvor immunzytochemisch diagnostizierten Meningeosis carcinomatosa, die anderen vier von Frauen, bei denen jeweils eine lymphatische Vorerkrankung bestand (zur Spezifizierung siehe Tabelle 33).

#### **3.4.7.1 Immunzytochemische Untersuchungen zur Identifikation epithelialer Tumorzellen - Liquorpunktate**

Bei dem Patienten mit im selben Jahr immunzytochemisch diagnostizierter Meningeosis carcinomatosa wurde in einer Verlaufskontrolle bei negativer konventioneller Zytologie sicherheitshalber das Markerpanel BerEP4 und HEA125 eingesetzt. Auch das Ergebnis der immunzytochemischen Untersuchung ergab keine Hinweise auf Tumorzellen mehr, so dass die negative Diagnose blieb.

#### **3.4.7.2 Immunzytochemische Untersuchungen zur Identifikation und eventuellen Typisierung von lymphatischen Erkrankungen - Liquorpunktate**

Bei jeweils einer Patientin war das Liquorpunktat konventionell-zytologisch als zweifelhaft bzw. dringend verdächtig eingestuft worden, bei den übrigen beiden als negativ. Aufgrund der bekannten lymphatischen Vorerkrankungen wurden jeweils die

immunzytochemischen Marker CD20 und CD45RO angewandt. Der zytologisch „zweifelhafte“ Befund konnte immunzytochemisch geklärt werden, die Befunde sprachen für das Vorliegen einer Liquorbeteiligung bei klinisch bekanntem Non-Hodgkin-Lymphom („positiv“). Die als „dringend verdächtig“ eingestufte Probe wurde nach Immunzytochemie als virale Entzündung und somit als „negativ“ eingestuft. Auch die beiden zwei zytologisch „negativen“ Proben wiesen keine Tumorzellen auf und blieben negativ (Tabelle 33).

Fall	Tumor vorbekannt?	Konventionelle Zytologie	Immunzytochemische Marker	Ergebnis
1	Ja  malignes großzelliges NHL	Zweifelhaft	CD20 (+) (60%)  CD45RO (+) (40%)	Positivität abnormer B-Lymphozyten;  „Befund spricht für eine Liquorbeteiligung bei bekanntem NHL“
2	Ja  CLL	Dringender Verdacht	CD20 (-)  CD45RO (+) (100%)	Monomorphe T-Tell-Population, damit eher virale Meningitis; keine CLL
3	Ja  B-Zell-Lymphom	Negativ	CD20 (-)  CD45RO (+) (100%)	T-Lymphozytenreiche Pleozytose
4	Ja  NHL  Z.n. Chemotherapie	Negativ	CD20 (-)  CD45RO (+) (100%)	T-Lymphozytenreiche Pleozytose

**Tabelle 33:** Überblick über zytologische und immunzytochemische Befunde im Rahmen der Bearbeitung von Liquorzytologien bei vorbekannter lymphatischer Vorerkrankung

### 3.4.8 Auswertung des Mundschleimhaut- und des Bindehautabstriches

In dem Untersuchungsgut waren nur zwei Abstriche (0,5%) von Oberflächen enthalten, und zwar jeweils einer von der Mundschleimhautabstrich und einer von der Bindehaut.

Bei einer Patientin mit dem Mundschleimhautabstrich bestand klinischerseits der Verdacht auf einen Pemphigus vulgaris, eine blasenbildende Hauterkrankung aus dem autoimmunem Formenkreis.

Die konventionelle Zytologie zeigte kein hierauf verdächtiges plattenepitheliales Zellbild und keine vermehrten spezifischen Entzündungszellen, die auf einen Pemphigus vulgaris hinweisen könnten. Das Bild ähnelte zytologisch eher einem „in Abheilung begriffenen Ulkus“. Ergänzend wurde immunzytochemisch ein Antikörper gegen IgG eingesetzt. Dabei zeigten sich keine vermehrten Zellen IgG-positiver Entzündungszellen. Daher lautete die abschließende Diagnose „Pemphigus vulgaris eher unwahrscheinlich“. Formal wäre der Befund, auch wenn es gar nicht um Tumorzellen ging, als „negativ“ abzuschließen.

Bei dem Patienten mit dem Bindehautabstrich war eine chronisch-lymphatische Leukämie (CLL) vorbekannt. Die konventionelle Zytologie zeigte eine „hämorrhagische Komponente und eine lymphofollikuläre Hyperproliferation“. Ergänzend wurden in dem Fall die immunzytochemischen Marker CD45RO und CD20 zur Beurteilung des T-Zell und B-Zell-Verhältnisses eingesetzt. Das Ergebnis brachte den Nachweis eines B-Zell-Proliferates als Hinweis auf mögliche CLL-Infiltrate („dringender Verdacht“).

## 4. Diskussion

Adjuvante Methoden sind heute aus der Pathologie nicht mehr wegzudenken, unabhängig davon, ob es sich um die seit langem etablierten konventionellen Sonderfärbungen (PAS, EvG, Eisen etc.), die Immunhistochemie / Immunzytochemie oder molekulare Verfahren handelt. Dabei kommt der Immunhistochemie und Immunzytochemie eine besondere Rolle zu, da mit ihrer Hilfe viele Fälle überhaupt erst zu einem sinnvollen und definitiven diagnostischen Abschluss gebracht werden können.

Die hier vorliegende Arbeit befasst sich mit der Anwendung von diagnostischen Immunverfahren an zytologischen Präparaten, somit mit der Immunzytochemie, in Abgrenzung zu ihrer Anwendung an histologischen Schnitten, der klassischen Immunhistochemie. Das Herausstellen dieses Unterschiedes ist wichtig, da beide Anwendungsfelder zwar die gleichen Fächer, nämlich die Pathologie und die Neuropathologie, betreffen, aber methodisch unterschiedlich sind. Während die Immunhistochemie an allen Instituten seit Jahren etabliert ist, wird die Immunzytochemie nicht an vielen Standorten angewandt. Diese Tatsache, dass an vielen Einrichtungen auf adjuvante Anwendungen an Ergüssen oder Punkttaten verzichtet wird bzw. bislang verzichtet werden muss, war die Motivation für diese Arbeit, nämlich am Beispiel des größten deutschen universitären Standortes für nicht-gynäkologische Zytologie die Bedingungen und Möglichkeiten der Immunzytochemie darzustellen.

### 4.1 Immunanwendungen an Histologie und Zytologie - Gemeinsamkeiten und Unterschiede

Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Gewebe (Histologie) und Zellen (Zytologie) haben nicht nur Konsequenzen für die konventionelle Befundung, sondern setzen sich auch bezüglich möglicher immunhistochemischer und immunzytochemischer Anwendungen fort.

Histologische Schnitte geben prinzipiell einen guten zweidimensionalen Überblick über ein dreidimensionales Gewebe und ermöglichen eine Beurteilung geometri-

scher Zusammenhänge zwischen z.B. einer epithelialen Oberfläche und dem darunter liegenden Stroma im Hinblick z.B. auf Oberflächendefekte, Art und Ausdehnung einer Entzündungsreaktion oder auf die eventuelle invasive Verbringung suspekter epithelialer Zellen in das Stroma. Bezogen auf eine diagnostische Biopsie, erfasst die Gewebentnahme aber lange nicht immer die gesamte Struktur, so dass man eine repräsentative Entnahme gerade bei sehr kleinen Stanzungen nicht voraussetzen kann. Außerdem entsteht eine gewisse Traumatisierung des Gewebes, verbunden mit einem gewissen Operationsrisiko (Nachblutungen, Entzündungen etc.). Zudem beschränkt sich die Histologie auf Prozesse mit soliden Anteilen und ist für die Bearbeitung von Körperflüssigkeiten (Urin, Liquor, seröse Körperhöhlenergüsse) ungeeignet.

Zytologische Entnahmen gibt es auf zweierlei Art.

- Zum einen wären die Punktionszytologie von Raumforderungen (z.B. Feinnadelpunktion der Gl. parotis oder der Leber) und die Abstrichzytologie von Oberflächen (z.B. Bürstungen der Gallenwege oder Bronchien) zu nennen; hier steht die Zytologie jeweils in gewisser Konkurrenz zur Histologie. Ihre Vorteile in diesem Zusammenhang sind, dass Entnahmen annähernd atraumatisch möglich sind und Zellen von einer größeren epithelialisierten Oberfläche abgestrichen werden können, während sich die Biopsieentnahme auf einen gewissen Bereich beschränken muss. Der Nachteil ist der fehlende Bezug der gewonnenen Zellen zum Stroma, den der zytologisch tätige Pathologe nicht rekonstruieren, aber sich in manchen Anwendungen aus zytologischen Details ableiten kann (z.B. sogenannter „schmutziger Hintergrund“, Aspekte der Zellkohäsion, Nachweis älteren Blutes).

Dabei ist die oben genannte „Konkurrenz“ zwischen bioptischer Entnahme für die Histologie und Punktion bzw. Abstrichentnahme für die Zytologie in vielen Fällen dadurch auflösbar, dass beide Methoden komplementär angewandt werden. Diese Vorgehensweise ist beispielsweise in der Abklärung pulmonaler Raumforderungen längst üblich, indem man Sekret absaugt oder den Bronchus spült, dann von der bronchialen Oberfläche eine Bürstung vornimmt und schließlich biopsiert.

- Zum anderen müssen hier die oben bereits erwähnten Flüssigkeitsentnahmen genannt werden. Von diesen sind von den Eingangszahlen her insbesondere Ergusspunktate aus der Pleurahöhle und der Bauchhöhle sowie Urinflüssigkeiten (Spontanurin / Katheterurin) zu nennen. Andere Entnahmen wie Liquor, Perikardflüssigkeit oder Zystenpunktate (Schilddrüse / Ovar) sind deutlich seltener. Flüssigkeitspunktate haben kein biotisches Pendant, sofern man nicht offene Biopsien an der Pleura parietalis oder dem Peritoneum etc. durchführen möchte, sind also eine exklusive Domäne der Zytologie.

Diese gewissen Unterschiede in der Materialart und auch der Materialverarbeitung bedingen Unterschiede in den Immunanwendungen. Von einem histologischen Block von z.B. 4 mm Stärke stehen bei einer Schnittdicke von z.B. 4 µm theoretisch 1000 Schnitte zur Verfügung, so dass in aller Regel die Zahl der einsetzbaren Antikörper als unbegrenzt gelten kann, vorausgesetzt, die zu beurteilende Region ist auf den Folgeschnitten noch ausreichend lange präsent. Von Feinnadelpunktaten und Bürstungen gibt es hingegen genauso viele Ausstriche, wie der Kliniker herstellt, und lange nicht auf jedem von ihnen müssen ausreichend viele Zellen der zu untersuchenden Zellpopulation für Immunanwendungen liegen. Auch wenn man mehrere Antikörper auf einem zytologischen Präparat anwendet, indem man beispielsweise mit einem DAKO-Pen das Präparat in verschiedene Abschnitte unterteilt, die man einzeln (dann aber nur manuell, nicht im Färbeautomaten) mit Antikörpern beschicken kann, bleibt die Zahl anwendbarer Antikörper stets beschränkt. Gleiches gilt für Flüssigkeitspunktate - sofern die Präparate nicht „randvoll“ mit Tumorzellen sind, ist auch dort die Zellzahl auffälliger Zellen oft limitiert, was die Möglichkeiten der Immunzytochemie begrenzt.

Aus diesem Dilemma gibt es zwei weiterhelfende Auswege. Zum einen könnte man, was in manchen Einrichtungen propagiert, in anderen abgelehnt wird, Feinnadelpunktate vom Kliniker nicht ausstreichen, sondern in ein flüssiges Medium bringen lassen, so dass dann eine Verarbeitung als Dünnschichtzytologie erfolgen könnte. Zum anderen ist bei allen Flüssigkeiten die Herstellung von Zellblöcken möglich, bei denen das zytologische Material nach Anreicherung durch Zentrifugation in einem Proteinkoagulat eingeschlossen wird, aus dem dann wiederum ein Paraffinblock für

die histologische Weiterverarbeitung gewonnen wird - diese Methode hat sich flächendeckend als zweites Standbein in der Zytologie durchgesetzt, war aber im Jahr 2009, auf das sich diese Arbeit bezieht, am Standort Düsseldorf aus hausinternen Gründen nicht routinemäßig etabliert, sondern Ausnahmen vorbehalten.

Die dargestellten Bedingungen und Möglichkeiten von Histologie und Zytologie zeigen, dass sich die Methoden beider Teilbereiche der Pathologie letzten Endes in manchen Details unterscheiden. Die unterschiedlichen Anwendungsgebiete begründen dabei aber, weswegen auch für zytologische Präparationen Immunanwendungen Sinn machen. Leider zeigte sich schon früh, dass eine einfache Übertragung von Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten etc. aus der Immunhistochemie nicht zu einem auswertbaren Färbeergebnis führte. Dieses wurde unter anderem darauf zurückgeführt, dass in der Zytologie komplette Zellen untersucht werden, die noch über erhaltene Gesamtstrukturen an Zellmembran, Zellkern und Zytoplasma verfügen, während in der Histologie alle diese Strukturen bereits geschnitten sind und damit eine andersartige Penetration von Antikörpern verwendeten Lösungen bestand. Entsprechend war es schwierig, die Immunzytochemie technisch zu etablieren. Noch heute verzichten viele Institute darauf, sie neben der Immunhistochemie vorzuhalten, eben weil die notwendigen Modifikationen Zeit brauchen, personalintensiv sind und letztendlich für nur wenige Fälle vorgehalten werden müssten. Von der Dimension muss man sich vorstellen, dass an üblichen größeren Einrichtungen das Verhältnis von Histologie zu (extra-gynäkologischer) Zytologie etwa 15:1 bis über 20:1 beträgt, so dass die Zytologie nicht nur im Bewusstsein vieler Pathologen ein Schattendasein führt (Biesterfeld und Maschek 2015), sondern auch in der Häufigkeit im Eingangsmaterial, an dem sie vielfach nicht mehr als 1.000 - 2.000 Fälle pro Jahr stellt, also bezogen auf die gesamte Palette der Einsendematerialien nicht mehr als 5 bis 10 Fälle pro Tag.

#### **4.2 Die Rolle der Zytologie und der Immunzytochemie in der morphologischen Diagnostik am Standort Düsseldorf**

Das damalige Institut für Cytopathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf, heute geführt als eigenständiger Funktionsbereich innerhalb des Instituts für Pathologie, stellt bezogen auf die oben geschilderten Verhältnisse eine Ausnahme dar. Es

wurde 1976 aus dem Institut für Pathologie ausgegründet und unter seinen Leitern Pfitzer (1976-1994, zeitgleich ab 1987 Dekan), Böcking (1994-2009), Biesterfeld (2009-2015) und aktuell Schramm (seit 2015) zum größten universitären Schwerpunkt im Bereich der extra-gynäkologischen Zytologie ausgebaut bzw. weitergeführt. Vorgehalten werden dort neben der konventionellen Zytologie auch die Immunzytochemie, die DNA-Bildzytometrie, die AgNOR-Histochemie, die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und molekulare Verfahren, wobei die Hinzunahme der multiplen adjunktiven Methoden insbesondere in die Amtszeit Böckings fiel. Insgesamt werden im Jahr mehr als 10.000 Fälle bearbeitet, die nicht nur aus dem Universitätsklinikum Düsseldorf, sondern aus dem gesamten rheinischen Großraum stammen. Entsprechend macht es Sinn, an solch einem Schwerpunkt einmal eine Zwischenbilanz zu der Frage zu ziehen, was die Immunzytochemie als adjunkte Methode in einem definierten Zeitraum in der Routineanwendung leisten kann. Hierfür wurde, als die Studie projektiert wurde, das Jahr 2009 ausgewählt.

Bezogen auf die in Kapitel 3 getroffenen Unterteilungen soll zunächst die Verteilung der Gesamteinsendungen in Beziehung zu den immunzytochemischen Anwendungen gesetzt werden (Tabelle 34):

Eingangsmaterialien	Gesamtzahl	davon immunzytochemisch untersucht (n / %)	
Pleurapunktate	1947	189	9,7%
Feinnadelpunktate	446	93	20,9%
Aszitespunktate	747	62	8,3%
Bronchialzytologien	3451	12	0,3%
Perikardpunktate	56	9	16,1%
Liquorpunktate	298	5	1,7%
Douglaspunktate	13	4	30,8%
Mundhöhlenabstriche	1777	1	0,1%
Bindehautabstriche	26	1	3,8%

**Tab. 34:** Datenübersicht zum Eingangsmaterial des Instituts für Cytopathologie und zu immunzytochemischen Anwendungen im Jahr 2009

Die Zahlen zeigen, dass nicht alle Materialien in gleichem Maße zu immunzytochemischen Untersuchungen herangezogen worden sind, was letztendlich den Spezifika der Fragestellungen und der Materialien geschuldet ist. Dazu zwei Beispiele bezogen auf diametral verschieden häufig vorkommende Anwendungen: Bei Ergussflüssigkeiten (aufsummierte Quote immunzytochemischer Anwendungen für Pleura-, Aszites-, Perikard- und Douglasflüssigkeit: 9,6%) geht es häufig um die Sicherung von Tumorzellen eines Adenokarzinoms, wobei die Palette der Möglichkeiten der Tumorherkunft hier groß ist - was sowohl begründet, dass Maßnahmen zur Tumorsicherung, als auch zur Tumortypisierung häufiger ergriffen werden müssen. Bei Mundhöhlenabstrichen, die nur in einem von 1777 Fällen immunzytochemisch adjuvant untersucht wurden, stellt sich zwar auch in nicht wenigen Fällen die Frage nach einem Tumorgeschehen, aber beschränkt sich (von wenigen Ausnahmen abgesehen) auf den Formenkreis der primären, ortsständig entstandenen Plattenepithelkarzinome und ihrer Vorstufen, wohingegen hier Adenokarzinome oder Fernmetastasen anderer Tumoren praktisch keine Rolle spielen. Entsprechend hat die Immunzytochemie hier keinen wesentlichen Platz.

Im Folgenden soll auf die verschiedenen Indikationen der Immunzytochemie eingegangen werden.

#### **4.2.1 Immunzytochemische Anwendungen zur Tumoridentifikation**

Da es bei dieser Fragestellung fast immer um eine epitheliale Tumorbildung geht, ist es bei der Markerauswahl wichtig, möglichst spezifisch epitheliale Marker verwenden zu können. Diese Feststellung klingt möglicherweise trivial, ist es aber insofern nicht, als entsprechende spezifische Marker jedenfalls zum Teil zu der Zeit, als diese Studie konzipiert wurde, noch recht neu waren. Inzwischen können sie als etabliert gelten.

Der Mangel an spezifischen epithelialen Markern hat insbesondere in Ergusspräparationen (Pleura, Aszites, Perikard, Douglasraum) in der Vergangenheit zu Problemen geführt. Hier gilt es nämlich in erster Linie, eine Abgrenzung zwischen ortsständigen Mesothelien, Epithelien und Makrophagen herbeizuführen. Während sich Makrophagen inzwischen leicht über ihre CD68-, CD163- oder Lysozym-Positivität

identifizieren lassen, ließen sich zumindest in der jüngeren Vergangenheit Mesothelien und Epithelien nicht leicht auseinanderhalten. Übliche Zytokeratine sind nämlich bei beiden Zellarten positiv, auch im Mesothel, da dieses vom Mesoderm abstammt, so dass sie nicht hilfreich sind. Die ersten „Mesothelmarker“ wiederum waren nicht sehr spezifisch und werden heute nur noch als Hilfsgrößen verwendet, z.B. HBME-1, das in seinen ersten beiden Buchstaben nach seinem Entwickler, dem Immunhistochemie-Pionier Hector Battifora, benannt ist. Auch ähnliche Marker wie Mesothelin sind inzwischen verlassen worden.

Etwa zu der Zeit, aus der die hier analysierten Immunanwendungen stammen, richtete sich ein gewisses Augenmerk auf die Antikörper der EpCAM-Gruppe, die je nach Anbieter oder konkretem Klon als HEA125, BerEP4, MOC-31, ESA etc. firmieren. Das Antikörper-Panel zur Tumoridentifikation war entsprechend im Jahr 2009 noch neu, und Ende 2009 lief im Institut für Cytopathologie noch eine Validierungsstudie mit der Industrie, mit der die Eignung einiger EpCam-Marker für die klassische Zytologie (in Abgrenzung gegenüber Zellblöcken) belegt wurde.

EpCam (*epithelial cell adhesion molecule*), nach dem der gleichnamige Antikörper benannt ist, ist ein epitheliales Zelladhäsionsmolekül bzw. Oberflächenprotein, das an der baso-lateralen Zelloberfläche verschiedener Epithelzellen, wie z.B. im Magen, dem Darmtrakt, den Gallengängen oder beispielweise in den Schleimhäuten der Bronchien und der Harnblase zu finden ist. Auf Tumorzellen, bei denen es sich üblicherweise um sich schneller teilende Zellen handelt, wird EpCam vermehrt gebildet, sodass es auch auf der Zelloberfläche von Epithelzellarten, die in der Regel kein EpCam bilden, detektiert werden kann. Dieser Effekt ist beim Plattenepithelkarzinom wesentlich. Die immunzytochemische Färbereaktion von EpCam-Antikörpern wäre entsprechend baso-lateral/membranär zu erwarten.

Die EpCam-Antikörper sind auch jetzt im Jahr 2023, also 14 Jahre später, in der Zytologie und der Histologie von Körperhöhlenergüssen bzw. Körperhöhlenbiopsien in sozusagen täglichem Gebrauch, gerade auch in paralleler Anwendung mit einem der oben erwähnten Makrophagenmarker und mit Calretinin, dem derzeit anerkanntesten Mesothelzellmarker. So weist es auch das in Kapitel 2.4.3 dargelegte Panel aus, dessen Zusammensetzung immer noch aktuell ist.

Die Leistungsfähigkeit des Panels sollte in der hier vorliegenden Arbeit nicht in Form eines exakten Follow-Ups überprüft werden, sondern ist in der Literatur bereits verschiedentlich analysiert worden. Dabei sind mehrere Konstellationen zu bedenken, die beachtet werden müssen. Neben der klassischen Situation, dass Epithelzellen (und damit auch epitheliale Tumorzellen) EpCAM-positiv und Calretinin-negativ sind und die Mesothelzellen gegenläufig färben, können sowohl bei Epithelzellen, als auch bei Mesothelzellen Ko-Expressionen beider Marker vorliegen. Außerdem kann gegenüber den Erwartungen ein Markerverlust vorkommen, beispielsweise bei schlechtem Zellerhalt. Auch Nacktkerne sind naturgemäß EpCAM-negativ, da diese Marker an der dann nicht mehr vorhandenen Zellmembran binden.

In unserer Studie konnten 76 (84,4%) von 90 Fällen von Ergusspräparaten, in denen an das Vorliegen von Tumorzellen gedacht worden war, durch Anwendung des Markerpanels aus BerEP4, HEA125, Calretinin und CD68 gelöst werden. Dabei erwiesen sich 46 Fälle als reaktiv bzw. tumorfrei. 14 Fälle blieben diagnostisch offen. Insgesamt konnten somit durch das eingesetzte „Grundpanel“ von den 23 „dringend verdächtigen“ Fällen 19 gelöst werden (83%).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch untersucht werden, inwieweit man die Vorgehensweise im Institut für Cytopathologie als standardisiert ansehen kann. Eine maximale Standardisierung würde bedeuten, dass alle „dringend verdächtigen“ oder „zweifelhaften“ Ergusspräparationen mit dem Markerpanel untersucht würden, „positive“ oder „negative“ aber nicht, da bei bereits klarer Festlegung in der konventionellen Zytologie hierfür keine Indikation mehr besteht. Hieran wurde sich annähernd vollständig gehalten. Nur in wenigen Fällen wurde abweichend vorgegangen, also beispielsweise auch eine BerEP4-Immunzytochemie bei positivem zytologischem Befund durchgeführt. Aus der Retrospektive ließ sich eine Rationale hierfür in den wenigen Fällen nicht mehr eindeutig erkennen.

Zusammenfassend haben die immunzytochemischen Untersuchungen rein zur Tumorentifikation zu einer Änderung der Diagnosegruppe in 95% der untersuchten Fälle (90/95) geführt.

#### 4.2.2 Immunzytochemische Anwendungen zur Typisierung epithelialer Tumoren und zur Abgrenzung gegenüber malignen epithelialen Mesotheliomen

Das 2009 eingesetzte grundlegende Markerprofil zur Tumortypisierung von Adenokarzinomen bestand aus zwei differentiellen Zytokeratinen (CK7, C20) und drei „organtypischen“ Markern (cdx-2, TTF-1, CA125) und ist auch heute noch in Düsseldorf in Gebrauch, allerdings ergänzt um einen weiteren „organtypischen“ Marker, nämlich GATA-3, der 2009 hier noch nicht für die Zytologie etabliert war. In Tabelle 35 sind nach der von Frisman ab ca. 2000 aufgebauten (Wheeler 2002) und inzwischen vom Elsevier Verlag kostenpflichtig betriebenen Datenbank *Immunoquery* entsprechende Übersichtsdaten für die Expressionsmuster dieser Marker für Adenokarzinome der Lunge, des Kolons und des Rektums, des Ovars und der Mamma wiedergegeben (Immunoquery 2023).

Immunhistochemischer Marker	Positivität verschiedener Karzinome			
	Lunge	Kolon und Rektum	Ovar	Mamma
CK7	97% 2451	17% 2501	96% 362	91% 2180
CK20	6% 1475	86% 3088	24% 348	3% 1707
cdx-2	11% 1125	87% 7668	25% 381	0% 570
TTF1	81% 9668	4% 2347	2% 172	1% 1572
CA125	24% 262	17% 241	80% 318	14% 183
WT-1	8% 699	0% 11	80% 100	11% 658
GATA-3	5% 743	1% 498	0% 39	77% 5493

Tabelle 35: Datenübersicht zur typischen Markerexpression von Adenokarzinomen der Lunge, des Kolons und des Rektums, des Ovars und der Mamma (Immunoquery 2023), bezogen auf Marker zur Typisierung; angegeben sind der Anteil positiver Fälle (in %, obere Zeile linksbündig) und die Fallzahl, auf die sich die Angaben beziehen (untere Zeile rechtsbündig).

Die Tabellendaten beziehen sich dabei auf zusammengeführte Daten von in der *Immunoquery* dokumentierten Publikationen an histologischen Fällen. Sie dürfen als gut begründete Anhaltspunkte für die Leistungsfähigkeit der Marker gelten, nicht aber als allumfassende „Wahrheit“ - es geht in die Datensammlung nicht ein, ob

beispielsweise ein Marker in einem Tumorgewebe viele oder wenige Tumorzellen angefärbt hat, ebenso nicht, ob die Färbeintensität stark oder schwach ist oder ob das Färbemuster als homogen oder inhomogen gelten darf. Für die Nutzbarkeit der Datensammlung spricht die in aller Regel hohe Fallzahl. Außerdem entsprechen die Datenverteilungen den inzwischen über die Jahre zusammengekommenen allgemeinen Erfahrungen in der histopathologischen Befundung.

Ihre Anwendbarkeit in der Zytologie bedarf aber formal eigener Zahlen, also Validierungsstudien, in denen die an Histologie etablierten Antikörper an identischen Fällen auch auf zytologische Fragestellungen angewandt worden sind. Dass man dabei an Zellblöcken im Vergleich zu Ausstrichen, also den beiden häufigsten heutigen Präparationsmethoden der Zytologie, zu im Wesentlichen gleichartigen Aussagen gelangt, wird implizit vorausgesetzt, wurde aber auch in einer aktuellen Studie an 220 Ergusspräparaten aus der Gynäko-Onkologie noch einmal bestätigt (Rekhi et al. 2020). Bei Durchsicht der Literatur zeigt sich, dass solche methodischen Studien im Prinzip fehlen. Stattdessen wird die Leistungsfähigkeit der Immunzytochemie am klinischen Ergebnis festgemacht.

Die verwendeten Markerpanel haben sich dabei im Laufe der Jahre verändert, insbesondere durch die Ersetzung früher, nicht sehr spezifischer Marker durch „bessere“ Neuentwicklungen. Gemäß einer Zusammenstellung von Ghosh et al. (1983) sind erste Studien zur Immunzytochemie 1979/80 veröffentlicht worden, wobei diese aber eher auf Einzelanwendungen von Markern als auf Panels beruhten. In den frühen 90er Jahren war dann aber der Panelgedanke bereits umgesetzt. So wurden beispielsweise ein Panzytokeratin, Vimentin, CEA und EMA verwendet, um Zellinfiltrate von Adenokarzinomen in Ergüssen zu identifizieren; in 39 von 46 Fällen gelang die klinisch richtige Unterscheidung (84,8%) (Daste et al. 1991). Eine Studie ein paar Jahre später arbeitete mit einem Panel, das neben der Sonderfärbung PAS-D die Antikörper CEA, EMA, B72.3, LeuM1 und Ber-Ep4 umfasste (Shield et al. 1996), im Einzelfall ergänzt um weitere. Bezogen auf ergusszytologische Präparate wurde die Immunzytochemie in 82% der Fälle als hilfreich empfunden. Von diesem Panel ist heute nur noch Ber-EP4 als EpCAM-Marker in regelhaftem Gebrauch.

Die in Düsseldorf selber angefertigten wissenschaftlichen Studien in der Cytopathologie gehen ebenfalls von einem Panelgedanken aus, mit dem versucht werden sollte, möglichst breit und dennoch möglichst spezifisch verschiedene Bereiche von diagnostischen Möglichkeiten abzudecken, jedenfalls bei Ergüssen. Hier wurde schon relativ früh an einem Panel gearbeitet (Motherby et al. 1999) und das bis heute in Anwendung befindliche Spektrum aus Calretinin (und anderen mesothelial exprimierten Markern) und EpCAM (und anderen epithelial exprimierten Markern) zur Abgrenzung zwischen mesothelialen und epithelialen Läsionen etabliert. An 141 Ergüssen von malignen Mesotheliomen ergab sich eine Gesamttreffsicherheit von 97,1% (Onofre et al. 2008b).

Bezogen auf die Tumortypisierung ergab sich im Laufe der 2000er Jahre der gewisse Luxus, dass organotypische Marker wie TTF-1, PAX-8, cdx-2, WT-1 oder GATA-3 entwickelt wurden, so dass es auf diese Weise möglich wurde, eine morphologische Verdachtsdiagnose auch immunzytochemisch zu untermauern. Dabei soll aber extra darauf hingewiesen werden, dass schon die Morphologie allein häufig eine Tumorzugehörigkeit in der Zytologie ermöglicht. Dafür kennt der erfahrene Zytologe z.B. die Morulabildung von Zellen eines invasiv-duktales Mammakarzinoms (NST), die massive Vakuolisierung und Psammkörperbildung beim Ovarialkarzinom, das einzelzellige monotone Zellbild von invasiv-lobulären Mammakarzinomen und das einzelzellige polymorphe Zellbild von diffusen Magenkarzinomen. Auch kleinzelligen Bronchialkarzinome verfügen über eine indikative Zytologie. Treten solche Zellbilder bei bekanntem Primärtumor dieser Art auf, so ist eine ergänzende Immunzytochemie im Grunde entbehrlich. Fehlt ein Primärtumor, so macht es auf jeden Fall Sinn, die morphologische Tumorentität immunzytochemisch zu hinterfragen. Auf die drei grundlegenden Studien zur Tumortypisierung an CUP-Syndromen, Lebermetastasen und Lymphknotenmetastasen mit Ergebnissen, die eine Identifikation des Primärtumors in 85,4% bis 94,8% ermöglichten, war bereits oben in Kapitel 1.1.4 hingewiesen worden (Pomjanski et al. 2005, Onofre et al. 2007, Onofre et al. 2008a).

Ebenfalls mit diesem Panel gelang es in unserer ein Jahr umfassenden Betrachtung der klinischen Zytologie als Routinemethode, 90 (74%) von 122 zur Tumortypisierung untersuchten Fälle komplett zu lösen. In anderen Fällen wurden ergänzend

weitere Marker hinzugenommen, beispielsweise wenn bestimmte, nicht über das Panel abgedeckte Entitäten wie ein Nierenzellkarzinom in die differentialdiagnostischen Überlegungen mit einging.

Auf ergänzende Antikörper, die nicht direkt mit einer Typisierung zu tun haben, sondern therapeutische oder prognostisch Abzweige eröffnen, konnte im Ergebnisteil nicht eingegangen werden. Dies gilt insbesondere für die vier bei Mammakarzinomen (und ihren metastatischen Absiedlungen) auch an Zytologie möglichen Untersuchungen zum Östrogen- und Progesteronrezeptor (ER, PR), zu Her-2/neu und zu Ki-67; dieses Expressionsmuster geht regelhaft in Planungen adjuvanter Medikationen ein. Es ist an zytologischen Präparaten mit hoher Konkordanz zur Histologie, die inzwischen in der Regel bei 85% bis 95% liegt, an zytologischen Präparaten bestimmbar (aktuell zusammengefasst von Pinto und Schmitt 2022). Ähnliches lässt sich auch für p16 zeigen, dessen „Blockpositivität“ im Plattenepithel einem Korrelat für eine HPV-Infektion, beispielsweise im HNO-Bereich oder an der Cervix uteri, entspricht; auch hier erwiesen sich die Färbeergebnisse zwischen Histologie und Zytologie als hoch korreliert (aktuell zusammengefasst von Doonan et al. 2022).

Die bisherigen Erörterungen waren den Adenokarzinomen gewidmet. Im Folgenden soll kurz auf Plattenepithelkarzinome eingegangen werden. Insgesamt kamen sie in unserem Patientengut nur selten vor. Dieses hat zum einen damit zu tun, dass sie in Ergusspräparationen, die ja 70,7% (264/376) unserer Fälle repräsentierten, ohnehin kaum auftreten, insbesondere fast nie im Aszites und in Douglaspunkaten. Die einzige häufigere Entität, die gelegentlich Anschluss an die Körperhöhlen gewinnt, sind Plattenepithelkarzinome der Lunge in Bezug auf Pleurahöhle und Perikard; dort sind sie dann aber in der Regel bereits morphologisch als plattenepithelien Ursprungs erkennbar und bedürfen somit nur in den wenigen Fällen, in denen man sich nicht zwischen einem Plattenepithelkarzinom und einem Adenokarzinom entscheiden kann, einer ergänzenden Untersuchung (z.B. mit CK7, p40 und TTF-1). Gleiches gilt auch, wenn Plattenepithelkarzinome in Feinnadelpunkaten oder Bronchialsekreten oder -lavagen auftreten. Zum anderen ist es so, dass sich innerhalb der Plattenepithelkarzinome bislang weder immunhistochemisch, noch im-

munzytochemisch Organzuordnen treffen lassen, also eine Unterscheidung zwischen Primärtumoren des oberen Aerodigestivtraktes, der Lunge, des HNO- oder MKG-Bereiches bzw. des Genitale ohnehin nicht möglich sind.

In engem Zusammenhang mit der Karzinomdiagnostik steht, sofern die Frage nach Malignität (siehe auch Fußnote 1) geklärt ist, die Mesotheliomdiagnostik. Der entscheidende Aspekt hier ist, die mesotheliale Genese des Malignoms zweifelsfrei zu belegen. Dies gelingt in Abgrenzung gegenüber einem Adenokarzinom über die übliche Positivität mesothelialer Läsionen mit Calretinin und WT-1 und Negativität gegenüber EpCAM. Adenokarzinome haben klassischerweise ein gegenläufiges Profil. Außerdem wird über den Makrophagenmarker CD68 ausgeschlossen, dass man irrtümlich einen makrophagenreichen Erguss für einen Erguss mit Tumorzellen hält. Eine entsprechende Recherche ergab bezogen auf eine große Zahl von Fällen verschiedener Studien folgendes Bild (Tabelle 36). Leider bietet die Immunoquery, aus der diese Daten stammen, keine Daten für Adenokarzinome im Allgemeinen an, weswegen wiederum typische Organtumoren stellvertretend erfasst wurden (Immunoquery 2023).

Immunhistochemischer Marker	Positivität verschiedener Karzinome				
	Mesotheliom	Lunge	Kolon und Rektum	Ovar	Mamma
Calretinin	90% 2384	14% 925	10% 484	20% 85	14% 807
WT-1	80% 1546	8% 699	0% 11	80% 100	11% 658
EpCAM-Marker (BerEP4 / HEA125)	12% 2087	92% 974	92% 211	94% 135	45% 1554
CD68	14% 7	0% 25	9% 43	--- ---	0% 33

**Tabelle 36:** Datenübersicht zur typischen Markerexpression von malignen Mesotheliomen sowie von Adenokarzinomen der Lunge, des Kolons und des Rektums, des Ovars und der Mamma, bezogen auf differentialdiagnostische Marker Immunoquery 2023); angegeben sind der Anteil positiver Fälle (in %, obere Zeile linksbündig) und die Fallzahl, auf die sich die Angaben beziehen (untere Zeile rechtsbündig).

Ein Immunprofil beispielsweise, das für Calretinin und WT-1 positiv sowie für EpCAM negativ ist, ist mit einer mesothelialen Läsion, eine passende Morphologie der Zellen vorausgesetzt, indikativ. Ebenso spricht jede deutlichere EpCAM-Expres-

sion eher für ein Adenokarzinom, das man dann aus morphologischen Überlegungen heraus mit weiteren Markern zu Typisierung beweisen kann. Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass sarkomatoide maligne Mesotheliome nicht selten ihre Calretinin-Expression verlieren und somit nicht auf der Basis dieses Markers identifiziert werden können (Johnen et al. 2017); andererseits treten diese Formen von Mesotheliomen kaum in Ergüssen auf (Galateau-Sallé 2006). Dass Calretinin auch in einer Reihe anderer Tumoren (Sexcord-Stromatumoren, Tumoren der Nebennierenrinde, Ameloblastome) exprimiert werden kann (Ordóñez 2014), spielt in der klinischen Zytopathologie keine wesentliche Rolle.

In unserer Studie ließen sich 21 von 22 Verdachtsfälle von malignen Mesotheliomen immunzytochemisch untermauern (95,5%), lediglich ein Fall blieb schlussendlich mit „dringend tumorverdächtig“ offen (4,5%).

#### **4.2.3 Immunzytochemische Anwendungen zur Typisierung nicht-epithelialer Tumoren**

Bezüglich nicht-epithelialer Tumoren spielt die Zytologie keine große Rolle, ebenso nicht die Immunzytochemie.

An den Oberflächen der Haut und der Schleimhäute wäre an melanozytäre Prozesse, als Nävi und maligne Melanome, zu denken. Sofern eine solche Läsion erodiert ist, also wundenartig nässt, wäre prinzipiell eine Gewinnung zytologischen Materials durch einen Abstrich denkbar. In der Realität des klinischen Alltags sind solche Präparate aber extrem selten, da im Zweifelsfall die primäre operative Entfernung als konsenterte Methode der Wahl anzusehen wäre.

Bei soliden Raumforderungen im Rahmen von Feinnadelpunktaten wären nicht-epitheliale Läsionen schon eher denkbar. Neben Metastasen von malignen Melanomen, die immer mit zu berücksichtigen wären, könnten prinzipiell auch alle Arten mesenchymaler Tumoren, sowohl gutartige, als auch bösartige, vorliegen. Hier wäre prinzipiell die Möglichkeit gegeben, durch geeignete Marker zumindest die

Histogenese (neuronal, lipomatös, fibrös, muskulär...) der Tumorzellen einzugrenzen. Sicherlich wird es auch möglich sein, bei hochmalignen Tumoren rein morphologisch eine Zuordnung zu einem Sarkom in Abgrenzung gegenüber einer benignen Tumorbildung zu treffen. Schwierig bis unmöglich aber bleibt die zytologische und immunzytochemische Einordnung der meisten Läsionen mit nur vergleichsweise geringen Atypien als gutartig oder bösartig. Ausnahmen könnten Fibromatosen (Positivität für E-Cadherin) oder solide fibröse Tumoren (SFT, Positivität für STAT-6) sein. Eine Anwendung an mesenchymalen Läsionen, die im Krankengut in Düsseldorf in seltenen Fällen vorkamen, allerdings nicht im hier analysierten Zeitraum 2009, waren transgastrale Punktate von Raumforderungen der Magenwand mit der Frage nach einem GIST (DD: Leiomyom oder neurogener Tumor). Hier wäre mit einem Markerprofil, das eine Positivität der Tumorzellen gegenüber (CD117) und DOG-1 und eine Negativität gegenüber Aktin, Caldesmon oder S-100 ausweist, eine sichere Diagnose zu stellen.

Bei allen Möglichkeiten, die die Zytologie theoretisch bietet, darf aber nicht übersehen werden, dass zytologische Proben aus mesenchymalen Läsionen selten bleiben und Stanzbiopsien oder offene Biopsien mit histologischer Aufarbeitung absolut im Vordergrund der diagnostischen Vorgehensweise stehen.

Differentialdiagnostisch wären auch maligne Lymphome zu bedenken, sowohl in Punktaten aus Raumforderungen, sondern mehr in Ergüssen oder im Liquor. Auch wenn sich zytologisch Fragen in Richtung eines malignen Lymphoms durchaus in bestimmten Fällen beantworten lassen können, bleiben die Möglichkeiten an Ausstrichen eingeschränkt, da nicht selten eine Fülle von Antikörpern angewandt werden muss. Hier ergeben sich entsprechend Vorteile in der Diagnostik durch Histologie bzw. bei Flüssigkeiten durch Durchflusszytometrie. Allerdings zeigt eine Arbeit an zellreichen Zellblöcken, dass, gutes Material vorausgesetzt, durchaus bereits solche zytologisch gewonnenen Minihistologien ausreichen, um sowohl eine Lymphomdiagnose, als auch eine Lymphomtypisierung verlässlich hinzubekommen. In einer Studie an 103 Lymphomen und 74 reaktiven Veränderungen wurden 173 der 177 Fälle richtig diagnostiziert (97,7%) und typisiert (Zhang et al. 2014).

### 4.3 Resümée und Ausblick

Die hier dargestellte Studie an immunzytochemischen Anwendungen bezog sich auf den definierten Zeitraum des Jahres 2009. Seitdem sind einige Jahre vergangen, in denen sich in der Pathologie manches gewandelt hat. Dieses gilt ganz allgemein für die zunehmende Bedeutung der molekularen Pathologie insbesondere bei Lungenkarzinomen oder im Bereich der Weichteilsarkome. Dennoch sind auch andere adjuvante Methoden wie die DNA-Bildzytometrie, histochemische Verfahren oder immunologische Anwendungen sicherlich nicht am Ende ihrer Möglichkeiten angewandt. Auch die Digitalisierung beginnt in der Pathologie Fuß zu fassen, indem verschiedene Institute Wege zur morphologischen Diagnostik am eingescannten Schnittpräparat beschreiten. Im Folgenden soll auf einzelne Aspekte eingegangen werden, die unser Themenfeld der Immunanwendungen in der Zytologie berühren.

#### Entwicklungen bei immunhistochemischen / immunzytochemischen Antikörpern

Wenn man sich vor Augen führt, wie viele neue Marker in den letzten 30 Jahren wissenschaftlich erprobt bzw. in der Krankenversorgung diagnostisch eingesetzt worden sind, dann mag es umso mehr überraschen, dass Panel von 2009 heute noch als diagnostisch sinnvoll gelten können.

Legt man die Panel zur Tumoridentifikation (BerEP4, HEA125, Calretinin, CD68) und zur Tumortypisierung (CK7, CK20, cdx-2, TTF-1, CA125, ergänzt um GATA-3) zugrunde und fügt im Bedarfsfall PAX-8, WT-1, ER, PR und Her-2/neu hinzu, so werden sich auch heute noch mit damals bereits etablierten Markern die allermeisten Fälle lösen bzw. wenigstens sinnvoll eingrenzen lassen. „Lösen“ hieße in diesem Zusammenhang eine exakte Zuordnung des Primärtumors, „sinnvoll eingrenzen“ bedeutete beispielsweise, dass man als Pathologe bei einem Adenokarzinom mit dem Immunphänotyp CK7+ / CK20- und einigen positiven Zellen für cdx-2 dem Kliniker eher eine Gastroskopie als eine Koloskopie als endoskopische Maßnahme empfiehlt, also seine naheliegende differentialdiagnostische Vorstellung, es handle sich in erster Linie um ein Karzinom des Magens, der Gallenwege oder des Pankreas, über einen Klartext-Kommentar auch in klinisch-bildgebende Empfehlungen umsetzt.

Außerdem sollte man nicht zu schnell auf eine angebliche „hochsensitive“ oder „spezifische“ Leistungskraft neuer Marker setzen. Immer wieder wurde Antikörper auf den Markt gebracht, die nach einer kurzen Phase wieder aus dem Bewusstsein der Diagnostiker verschwunden sind, nachdem sich ihre Sensitivität und Spezifität als geringer herausgestellt hatte als ursprünglich angenommen. Dies gilt nicht nur für Marker wie das historische NSE („Neuronen-spezifische Enolase“), das das Wort „spezifisch“ bereits im Namen trägt, sich aber später als so ubiquitär verbreitet darstellte, dass NSE jetzt im englischen Sprachraum als „*nearly stains everything*“ übersetzt wird. Das neueste Beispiel für einen in die Diagnostik vordringenden Marker ist das TRPS1, ein Marker, der wie GATA-3 Zellkerne von Mammakarzinomen anfärbt und zwei Schwächen des GATA-3 auflösen soll, nämlich dessen häufige Negativität in Triple-negativen Mammakarzinomen und die Positivität auch im Urothel. Diese kann willkommen sein, wenn ein Urothelkarzinom identifiziert werden soll, ist aber nicht hilfreich, wenn Patientinnen ein Urothelkarzinom und ein Mammakarzinom haben bzw. wenn beide Tumoren vermutet werden. Man wird abwarten müssen, ob die für beide Marker gemachten Angaben zu Expressionsraten in verschiedenen Tumorentitäten im täglichen Alltag auf Dauer bestätigt werden können (GATA-3: Miettinen et al. 2014, TRPS1: Ai et al. 2021).

Über die Diagnostik und Typisierung hinaus gehen seit 2009 entwickelte Markeranwendungen, die sich auf die immunologische Surrogatdarstellung molekularer prädiktiver, therapeutischer Eigenschaften beziehen und damit in den Formenkreis der prädiktiven Medizin fallen, auch „Theranostik“ genannt. Beispiele hierfür wären Antikörper gegen ALK und ROS-1, die bei Lungenkarzinomen nicht nur an Histologie, sondern auch an Zytologie eingesetzt werden können. Ferner wäre PD-L1 zu erwähnen, dessen Expression ausschlaggebend ist für die Indikation, Immuntherapeutika einzusetzen. Einer der drei Interpretationsmodi von PD-L1 (siehe hierzu Schildhaus 2018) bezieht sich rein auf die Bindung an der Zellmembran der Tumorzellen (TPS) und kann an Zytologien bestimmt werden. Die anderen beiden setzen die Bindung an den Tumorzellen mit derjenigen an begleitenden Entzündungszellen in Beziehung (CPS) bzw. beurteilen, wie groß der geschätzte Flächenanteil immunreaktiver Entzündungszellen im Tumor ist (IC-Score); naturgemäß können diese, da

bei der zytologischen Materialgewinnung bzw. -verarbeitung die Nachbarschaftsbeziehungen zwischen den Zellen verloren gehen, nicht bestimmt werden.

Die Validierungsstudien zu ALK, ROS-1 und PD-L1 an zytologischem Material wurden kürzlich in einem offiziellen Review der IASLC (*International Association for Studies on Lung Cancer*) unter Federführung einer in der wissenschaftlichen Zytopathologie führenden Einrichtung, dem Institut für Pathologie der Universität Basel, zusammengestellt (Jain et al. 2019). Aus ihnen leitet sich eine gute Übertragbarkeit der Färgergebnisse zwischen Histologie und Zytologie ab. Inzwischen wird versucht, Computer-gestützt und auf multimodalem Weg eine verlässlichere Bestimmung insbesondere an zytologischen Präparaten zu erreichen (Lozano et al. 2023).

### Entwicklungen bei Präparationsmethoden

Was die Präparationsmethoden betrifft, so wurde in Düsseldorf im Jahr 2009 ganz überwiegend „klassisch“ vorgegangen. Damit ist gemeint, dass solides, nicht-flüssiges Feuchtmaterial von Punktaten oder Abstrichen von den klinischen Kollegen bereits auf Objektträger aufgebracht und auch dort entweder luftgetrocknet oder durch die möglichst sofortige Anwendung alkoholischer Sprays Alkohol-fixiert wird. Liegen Flüssigkeiten vor, also Ergüsse, Liquor, Zystenpunktate, Flüssigkeiten der ableitenden Harnwege oder broncho-alveoläre Sekrete, so werden diese je nach speziellen Vorgaben entweder unfixiert oder in Alkohol-basierten Lösungen fixiert an die Zytopathologie übersandt und dort letztendlich nach Zentrifugation etc. in Sedimentausstriche überführt.

Alternativ bzw. komplementär hierzu stehen die Methoden der Dünnschichtzytologie und der Zellblocktechnik zur Verfügung. Bei der Dünnschichtzytologie werden Abstriche oder Feinnadelpunktate eben nicht vom Kliniker auf Objektträger aufgebracht, sondern in kleine, gewerblich erhältliche Gefäße überführt, die mit einer Fixationslösung gefüllt sind. Die weitere Präparategewinnung erfolgt dann in der Zytologie nach standardisierten Verfahren (z.B. SurePath, ThinPrep). Bei der Zellblocktechnik wird nach Zentrifugation oder Sedimentierung der Unterstand im Gefäß mit Proteinen versetzt, die zur Koagulation gebracht werden. Das entstandene gallertige Pellet wird dann wie ein fixiertes Gewebstück in einen Paraffinblock überführt und mit den üblichen Methoden der Histologie aufgearbeitet.

Während bei der Dünnschichtzytologie das morphologische Prinzip der Zytologie gewahrt bleibt, wird bei der Zellblocktechnik letztendlich Zytologie an histologischen Schnittpräparaten betrieben. Auf die Vor- und Nachteile beider Methoden kann im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden. Insgesamt aber liegen Zellblöcke klar im Trend der Zeit und finden bereits in vielen Instituten Anwendung, insbesondere auch in Österreich und der Schweiz, wo die Zytologie einen viel höheren Stellenwert genießt als in Deutschland. Die Ansprüche an die Pathologie als Gesamtfach sind in den letzten Jahren immer weiter gestiegen, insbesondere an die Fülle der Anwendung von adjuvanten Methoden; will die Zytologie da mithalten, wäre sie gut beraten, eine routinemäßige Anwendung der Zellblocktechnik zu überlegen, entweder als primäre Methode oder komplementär zur konventionellen Zytologie. Aufgrund der begrenzten Präparatezahl von Ausstrichpräparaten oder Sedimentausstrichen wird man ansonsten immer wieder auf Situationen stoßen, in denen sich spezielle Fragestellungen nicht beantworten lassen, weil die Präparate hierfür nicht ausreichen. Der Zellblocktechnik kommt heute auch am Standort Düsseldorf ein deutlich höherer Stellenwert zu als 2009.

Alles in allem lässt sich sagen, dass das seinerzeit eingesetzte Arsenal an diagnostischen Markern nach wie vor, von einzelnen Ausnahmen abgesehen, aktuell ist, dass also die Ergänzung der konventionellen Zytologie durch Immunzytochemie in der Routinediagnostik auf im Wesentlichen den gleichen Markern beruht. Die Hinzunahme von prädiktiven Markern eröffnet bereits heute neue Chancen in der morphologisch basierten Therapieplanung, die natürlich heute immer auch im Kontext von molekularpathologischen Entwicklungen gesehen werden muss. Das hieraus resultierende gestufte Modell des schrittweisen diagnostischen Vorgehens wird sicher auch in Zukunft modifiziert erhalten bleiben: Ohne konventionelle Morphologie (Schritt 1) keine rein diagnostischen morphologischen Ergänzungen (Schritt 2), und ohne deren wegweisenden Ergebnisse keine prädiktiven surrogatmorphologischen oder molekularen Folgeuntersuchungen (Schritt 3), die bekanntermaßen gut an zytologischem Material möglich sind (aktuell zusammengestellt bei Fassunke et al. 2020). Dieses Modell ist sowohl in der Histologie, als auch in der Zytologie tragfähig und inzwischen etabliert - im Jahr 2009, auf das sich unsere Untersuchung bezieht, war allerdings der Aufbau des dritten Schrittes noch allgemein in den Anfängen.

## 5. Literaturverzeichnis

Ai D, Yao J, Yang F, Huo L, Chen H, Lu W, Soto LMS, Jiang M, Raso MG, Wang S, Bell D, Liu J, Wang H, Tan D, Torres-Cabala C, Gan Q, Wu Y, Albarracin C, Hung MC, Meric-Bernstam F, Wistuba II, Prieto VG, Sahin AA, Ding Q: TRPS1: a highly sensitive and specific marker for breast carcinoma, especially for triple-negative breast cancer. *Mod Pathol* (2021), 34 (4):710-719. DOI: 10.1038/s41379-020-00692-8

Biesterfeld S: Zurverfügungstellung urheberrechtlich geschützter Abbildungen aus dem Bestand des Funktionsbereichs Cytopathologie (2015)

Biesterfeld S, Maschek C: Wie soll Zytopathologie gelehrt werden? *Pathologe* (2015), 36: 579-584. DOI: 10.1007/s00292-015-0097-9

Biesterfeld S, Pomjanski N, Schramm M: Adjuvante Methoden in der diagnostischen Zytopathologie. *Verh Dtsch Ges Zyt* (2013), 28: 8-16

Böcking A, Motherby H, Pomjanski N: Treffsicherheit der Ergusszytologie samt adjuvanten Untersuchungsmethoden. *Dtsch Ärztebl* (2000), Ausgabe A, 97 (40), 266-2630

Böcking A: Standardisierung der zytopathologischen Diagnostik. *Pathologe* (1998), 19 (3), 236-241. DOI: 10.1007/s002920050281

Bubendorf L, Feichter GE, Obermann EC, Dalquen P: Zytologische Tumorkriterien. In: Klöppel G, Kreipe HH, Remmele W (Hrsg.): *Pathologie, Band Zytopathologie*. 3. Auflage, Springer-Verlag (2011), 33-45

Dabbs DJ: *Diagnostic immunohistochemistry. Theranostic and genomic applications*. 5. Auflage, 2019, Elsevier Verlag, Philadelphia

Daste G, Serre G, Mauduyt MA, Vincent C, Caverivière P, Soleilhavoup JP: Immunophenotyping of mesothelial cells and carcinoma cells with monoclonal antibodies to cytokeratins, vimentin, CEA and EMA improves the cytodagnosis of serous effusions. *Cytopathology* (1991), 2 (1): 19-28. doi: 10.1111/j.1365-2303.1991.tb00380.x

Doonan K, Ambaye A, Buskey A, Mitchell J, Ciolino AL: Validation of p16 immunocytochemical staining on alcohol-fixed aspirate smears: A single-institutional study with review of the literature. *Cancer Cytopathol* (2022), 130 (5): 381-391. DOI: 10.1002/cncy.22557

Fassunke J, Ball M, Engels M: Molekularpathologische Diagnostik an zytologischen Präparaten. *Pathologe* (2020), 41: 39-45. <https://doi.org/10.1007/s00292-019-00733-3>

Francis IM, Alath P, George SS, Jaragh M, Al Jassar A, Kapila K: Metastatic breast carcinoma in pleural fluid: Correlation of receptor and HER2 status with the primary carcinoma-a pilot study. *Diagn Cytopathol* (2016), 44 (12), 980-986. DOI: 10.1002/dc.23607

Galateau-Sallé F: Pathology of malignant mesothelioma. Springer Verlag, Berlin, 2006

Ghosh AK, Spriggs AI, Taylor-Papadimitriou J, Mason DY: Immunocytochemical staining of cells in pleural and peritoneal effusions with a panel of monoclonal antibodies. *J Clin Pathol* (1983), 36 (10): 1154-1164. doi: 10.1136/jcp.36.10.1154

Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* (1981), 29 (4): 577-580. DOI: 10.1177/29.4.6166661

Immunoquery (Zitierweise): Immunoquery-Datenbank, Elsevier Verlag Amsterdam, 2023. Online unter <https://app.immunoquery.com/main>, zuletzt abgerufen am 14.12.2023

Jain D, Nambirajan A, Borczuk A, Chen G, Minami Y, Moreira AL, Motoi N, Papotti M, Rekhtman N, Russell PA, Savic Prince S, Yatabe Y, Bubendorf L, IASLC Pathology Committee: Immunocytochemistry for predictive biomarker testing in lung cancer cytology. *Cancer Cytopathol* (2019), 127 (5): 325-339. DOI: 10.1002/cncy.22137

Johnen G, Gawrych K, Raiko I, Casjens S, Pesch B, Weber DG, Taeger D, Lehnert M, Kollmeier J, Bauer T, Musk AW, Robinson BWS, Brüning T, Creaney J: Calretinin as a blood-based biomarker for mesothelioma. *BMC Cancer* (2017), 30: 17 (1):3 86. doi: 10.1186/s12885-017-3375-5

Khurram N, Anis T, Yusuf NW: Diagnostic accuracy of a limited immunopanel of calretinin and ber-EP4 for diagnosis of malignant effusions. *J Coll Phys Surg Pak* (2019): 29 (1), 33-36. DOI: 10.29271/jcsp.2019.01.33

Koss LG, Melamed MR: Koss' Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases. Lippincott Williams & Wilkins, New York, 2006

Lee JS, Nam JH, Lee MC, Park CS, Juhng SW: Immunohistochemical panel for distinguishing between carcinoma and reactive mesothelial cells in serious effusions. *Acta Cytol* (1996), 40 (4): 631-636. DOI: 10.1159/000333930

Leitlinienprogramm Onkologie: Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Langversion 4.4, Juni 2021, AWMF-Registernummer: 032-045OL

Lozano MD, Argueta A, de Andrea C: Immunotherapy and lung cytopathology: Overview and possibilities. *Cytopathology* (2023), in Druck („online ahead of print“). doi: 10.1111/cyt.13335

Metzgeroth G, Kuhn C, Schultheis B, Hehlmann R, Hastka J: Diagnostic accuracy of cytology and immunocytology in carcinomatous effusions. *Cytopathol* (2008), 19 (4): 205-211. DOI: 10.1111/j.1365-2303.2007.00468.x

Miédougé M, Rouzard P, Salama G Pujazon MC, Vincent C, Mauduyt MA, Reyre J, Carles P, Serre G: Evaluation of seven tumour markers in pleural fluid for the diagnosis of malignant effusions. *Brit J Cancer* (1999), 81 (6): 1059-1065. DOI: 10.1038/sj.bjc.6690807

Miettinen M, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Czapiewski P, Wazny K, Langfort R, Waloszczyk P, Biernat W, Lasota J, Wang Z: GATA-3: a multispecific but potentially useful marker in surgical pathology: a systematic analysis of 2500 epithelial and nonepithelial tumors. *Am J Surg Pathol* (2014), 38 (1): 13-22. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3182a0218f.

Mohanty SK, Dey P: Serous effusions: diagnosis of malignancy beyond cytomorphology. An analytic review. In: *Postgrad Med J* (2003), 79 (936): 569-574. DOI: 10.1136/pmj.79.936.569.

Motherby H, Kube M, Friedrichs N, Nadjari B, Knops K, Donner A, Baschiera B, Dalquen P, Böcking A: Immunocytochemistry and DNA-image cytometry in diagnostic effusion cytology I. Prevalence of markers in tumour cell positive and negative smears. *Anal Cell Pathol* (1999), 19 (1) :7-20. doi: 10.1155/1999/459158

Motherby H, Nadjari B, Friegel P, Kohaus J, Ramp U, Böcking A: Diagnostic accuracy of effusion cytology. *Diagn Cytopathol* (1999), 20 (6): 350-357. DOI: 10.1002/(sici)1097-0339(199906)20:6<350::aid-dc5>3.0.co;2-7

Onofre A, Pomjanski N, Buckstegge B, Böcking A: Immunocytochemical diagnosis of hepatocellular carcinoma and identification of carcinomas of unknown primary metastatic to the liver on fine needle aspiration cytologies. *Cancer Cytopathol* (2007), 111: 259-268. DOI: 10.1002/cncr.22768

Onofre A, Pomjanski N, Buckstegge B, Böcking A: Immunocytochemical typing of primary tumors on fine needle aspiration cytologies of lymph nodes. *Diagn Cytopathol* (2008a); 36: 207-215. DOI: 10.1002/cncr.23413

Onofre FB, Onofre AS, Pomjanski N, Buckstegge B, Grote HJ, Böcking A. 9p21 Deletion in the diagnosis of malignant mesothelioma in serous effusions additional to immunocytochemistry, DNA-ICM, and AgNOR analysis. *Cancer* (2008b), 114 (3): 204-215. DOI: 10.1002/cncr.23413

Ordóñez NG: Value of calretinin immunostaining in diagnostic pathology: A review and update. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* (2014), 22: 401-415. doi: 10.1097/PAI.0b013e31829b6fbd

Pinto D, Schmitt FC: Immunohistochemistry applied to breast cytological material. *Pathobiol* (2022), 89 (5): 343-358. DOI: 10.1159/000522542

Pokieser L, Bernhardt K, Kreuzer A, Schalleschak J: *Klinische Zytologie der Lunge und Pleura. Handbuch und Farbatlas.* Springer Verlag Wien, 2001

Pomjanski N, Grote HJ, Doganay P, Schmiemann V, Buckstegge B, Böcking A: Immunocytochemical identification of carcinomas of unknown primary in serous effusions. *Diagn Cytopathol* (2005), 33: 309-315. DOI: 10.1002/dc.20393.

Rekhi B, Karmarkar S, Gupta C, Deodhar KK, Menon S, Pathuthara S, Maheshwari A, Shylasree TS, Gupta S: Evaluation of cell blocks from effusion specimens in gynecologic oncopathology: An experience of 220 cases, diagnosed at a tertiary cancer referral center. *Indian J Pathol Microbiol* (2020), 63 (3):427-434. DOI: 10.4103/IJPM.IJPM\_858\_19

Schildhaus HU: Der prädiktive Wert der PD-L1-Diagnostik. *Pathologe* (2018), 39 (6): 498-519. DOI: 10.1007/s00292-018-0507-x

Shabaik A, Lin G, Peterson M, Hasteh F, Tipps A, Datnow B, Weidner N: Reliability of Her2/neu, estrogen receptor, and progesterone receptor testing by immunohistochemistry on cell block of FNA and serous effusions from patients with primary and metastatic breast carcinoma. *Diagn Cytopathol* (2011), 39 (5): 328-332. DOI: 10.1002/dc.21389.

Shield PW, Perkins G, Wright RG: Immunocytochemical staining of cytologic specimens. How helpful is it? *Am J Clin Pathol* (1996), 105 (2): 157-162. doi: 10.1093/ajcp/105.2.157

Silverman JF, Nance K, Phillips B, Norris HT: The use of immunoperoxidase panels for the cytologic diagnosis of malignancy in serous effusions. *Diagn Cytopathol* (1987), 3 (2): 134-140. DOI: 10.1002/dc.2840030209.

Subbarayan D, Bhattacharya J, Rani P, Khuraijam B, Jain S: Use of panel of markers in serous effusion to distinguish reactive mesothelial cells from adenocarcinoma. *J Cytol* (2019), 36 (1): 28-31. DOI: 10.4103/JOC.JOC\_13\_18.

Sun F, Wang P, Zheng Y, Jia W, Liu F, Xiao W, Bao J, Wang S, Lu K: Diagnosis, clinicopathological characteristics and prognosis of pulmonary mucinous adenocarcinoma. *Oncol Lett* (2018), 15 (1): 489-494. DOI: 10.3892/ol.2017.7312

Wheeler D: Pathology and the internet. *Adv Anat Pathol* (2002); 9 (4): 261-262

Zhang S, Yu X, Zheng Y, Yang Y, Xie J, Zhou X: Value of fine needle aspiration cell blocks in the diagnosis and classification of lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol* (2014), 7 (11): 7717-7725

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld für die Überlassung des Themas und die stetige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Ganz herzlichen Dank für die vielen konstruktiven Besprechungen, Hilfestellungen, Ratschläge und freundlichen Gespräche, die wir bis zur Vollendung meiner Dissertation geführt haben.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie und Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, die mir mit Rat zur Seite gestanden haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich insbesondere bei meinen Eltern Christina und Waldemar Jaschinski, sowie bei meinem Partner, meiner Familie und all meinen Freunden bedanken, die bis zum Schluss an mich und das Gelingen dieser Dissertation geglaubt haben.