

Verdacht auf Meningeosis Carcinomatosa – Liquordiagnostik am Sysmex XT-4000i

Xtra Schweiz | März 2012 | Nr. 9

Ein Fallbeispiel aus der neurologischen Klinik des Johannes Wesling Klinikum in Minden

Autor: Fr. Barbara Schröder, Leitende MTA, Zentrallabor Fachbereich Hämatologie

Eine 71jährige Patientin wird in der neurologischen Klinik des Klinikums Minden mit den Symptomen von Dysarthrie (einer Störung des Sprechens, verursacht durch erworbene Schädigung des Gehirns und der peripheren Gesichtsnerven*), Ataxie (Störungen der Bewegungskoordination*) sowie mit sogenannten GM-Anfällen (generalisierter Anfall mit Krämpfen wie bei einer Epilepsie) aufgenommen. Bei dieser Patientin wurde 6 Monate zuvor ein lymphogen metastasiertes Urothelkarzinom der Harnblase diagnostiziert. Das Labor bekam eine Liquorprobe mit der Fragestellung Meningeosis carcinomatosa, eine Erkrankung, die sich ggf. aus dem vorangegangenen Tumor entwickeln kann. Zur Abklärung wurde eine liquorzytologische Untersuchung erbeten.

Die Bestimmung des Liquorstatus im Klinikum Minden umfasst folgende Parameter

- Makroskopische Beurteilung der Probe
- Zellzahl (ggf. Differenzierung)
- Zytologie
- Gesamteiweiss
- Laktat und Glukose
- Proteindiagnostik nach Reiber

Im Allgemeinen wird für die Bestimmung des Liquorstatus ein Röhrchen mit 5–7 mL Liquor benötigt. Zu beachten ist, dass die Zellzählung und die Anfertigung des zytologischen Präparates innerhalb einer Stunde erfolgen sollten, denn degenerative Veränderungen erschweren die zytologische Beurteilung. Daher wird nach dem Probeneingang das Material direkt an den Arbeitsplatz gebracht und sofort bearbeitet.

Die Zytolyse wird durch eine Lagerung des Liquors bei 4°–12°C verlangsamt. Höhere Temperaturen fördern die katabolen Mechanismen und somit die Zytolyse. Entscheidender Faktor hierfür ist der pH Umschlag von 7.32–7.36 auf 7.8 und höher. Bei längeren Transporten empfiehlt es sich, gekühlte Behälter zu verwenden.

Die Messung der Zellzahl mit dem Sysmex XT-4000i

Die Bestimmung der Zellzahl in Körperflüssigkeiten wie z. B. Liquor, Pleura oder Aszites erfolgt in unserem Labor mit Hilfe des Sysmex XT-4000i im Body Fluid Modus. Die technische Validation wird durch das SIS-Regelwerk für Körperflüssigkeiten (SIS = Sysmex-Information-System) unterstützt. 85µL Liquor werden ohne weitere Probenvorbereitung manuell im Body Fluid Modus angesaugt und gemessen. Dabei ist besonders wichtig, die Probe vor der Messung gut zu mischen, um eine gleichmässige Zellverteilung in diesem Präparat zu gewährleisten.

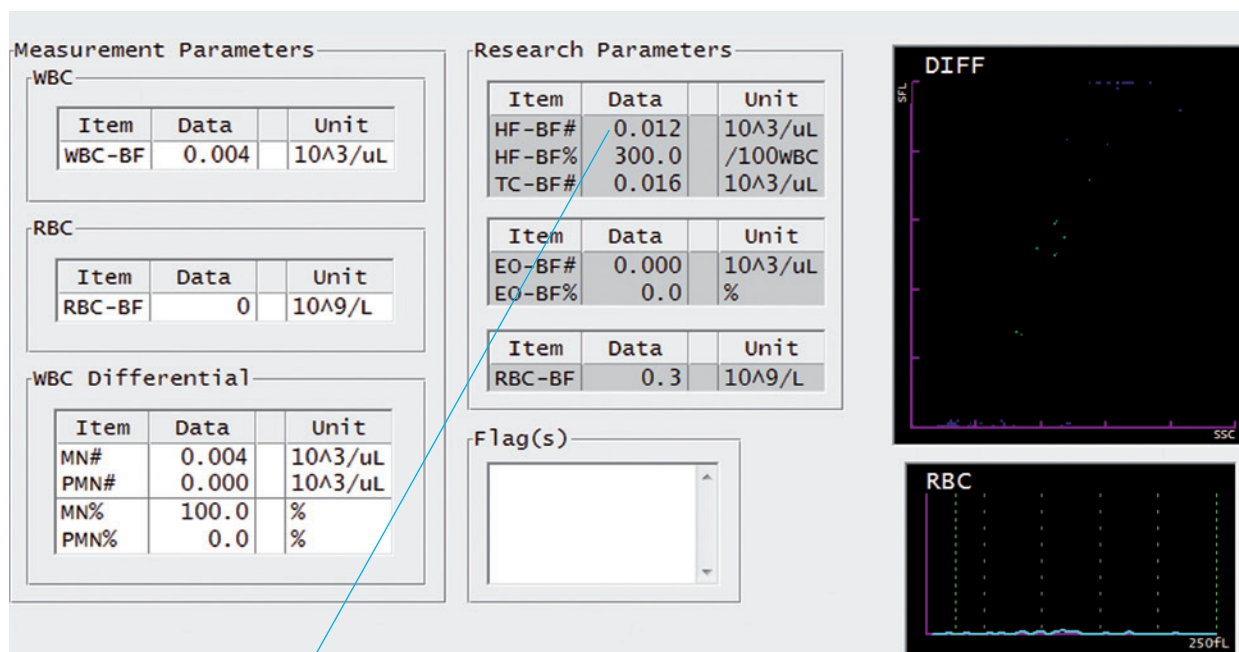


Abb. 1a XT-4000i: Ergebnisdarstellung der Liquormessung im Body Fluid Modus

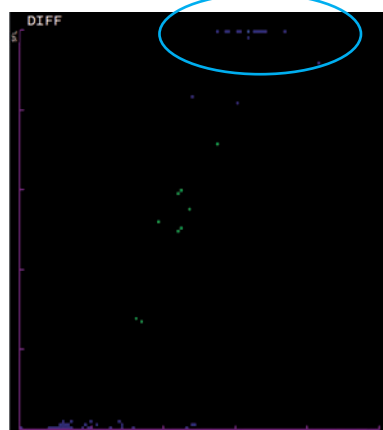


Abb. 1b DIFF Scattergramm
 Auffällig hier: Im Bereich hochfluoreszierender Zellen befindet sich ein grosser Anteil an Zellen. Die Anzahl dieser Zellen wird als Parameter HF-BF# dargestellt.

In der fluoreszenz-durchflusszytometrischen Messung wird die Anzahl der nukleären Zellen (WBC-BF) plus der hochfluoreszierenden Zellen (HF-BF) bestimmt. Die Gesamtzahl aller nukleären Zellen kann als Parameter TC-BF reportiert werden. (TC-BF = WBC-BF + HF-BF). Die Differenzierung der Zellen erfolgt in mononukleäre Zellen (MN= Monozyten und Lymphozyten) und polymorph-nukleäre Zellen (PMN=Granulozyten). Erythrozyten (RBC-BF) werden mittels Impedanzmessung in einem separaten Messkanal gezählt. Das Ergebnis der Messung wird im Sysmex-Information-System (SIS oder EPU) technisch validiert. Materialspezifische Regeln unterstützen dabei die Beurteilung der Probe und geben ggf. schon weitere Hinweise.

The screenshot shows the SIS software interface. At the top, there is a menu bar (SIS, Edit, View, Mode, Action, Window, Help) and a toolbar with icons for Close, Menu, Save, Print, Prev, Next, Validate, Option, View, Help, All Data, Historical, Diff Pad, and Retest. Below the menu, there are input fields for patient information: Accession No. (961), Sample No., Patient ID, and Pat. Name. To the right, there are fields for Sex, Age, Clinic, Ward, Urgent (Off), Coll. Source (Liquor), Coll. DT (2011-02-16 13:36), RACK, and TUBE. A 'Data Check' button and an 'Execute' button are visible. Below this, a 'Data Check Status' window is open, showing a table of test results and a 'Cause of Retest flagging' section. The table lists various tests with their results and status marks (I, #, %). The 'Cause of Retest flagging' section contains a table with 'Data Check' and 'Contents' columns, listing retest reasons like 'BF Review', 'Body Fluid Cytospin', and '83.Scattergramm beurteilen->ggf.Kammerzählung u. Cytospin?'. A legend at the bottom explains the status marks: I:Initial Order, #:Additional Order, %:Init + Add Order, M:Manual Validated, A:Auto. Validated, R:Review, Z:Retested.

Data Check	Contents
Retest Gr.	BF Review
	Body Fluid Cytospin
Rule Check	83.Scattergramm beurteilen->ggf.Kammerzählung u. Cytospin?
	91.Tumorzellen?
	94.Erythrophagen (alte Blutung)? -> Cytospin!

Abb. 2 SIS Bildschirm: Hinweise zur Validation

Bei der Messung von Körperflüssigkeiten sollten die Scattergramme immer mit beurteilt werden, da hier schon viel Information, abhängig von der Erfahrung des Betrachters, entnommen werden kann. Eine unterstützende Beurteilung der Probe leistet jedoch bereits das SIS mit den angezeigten Regeln. Bei dieser Probe wurde u. a. die Regel 91 mit dem Verdacht auf Tumorzellen angezeigt. Ausgelöst wurde diese Regel durch den hohen Anteil an hochfluoreszierenden Zellen und der Berücksichtigung der Information des Probenmaterials Liquor. Im Anschluss an die Zellzählung wird ein Zytospinpräparat zur zytologischen Beurteilung hergestellt.

Herstellung des zytologischen Präparats

Für die Zytologie werden ca. 4–7 mL Liquor benötigt. Durch eine besondere Verarbeitungstechnik, der Einengung des Liquors durch Zentrifugation, stehen z. B. bei 5 mL Liquor noch 4,8 mL für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung.

- Objektträger mit Namen, Anforderungsnummer, Datum oder mit dem ID-Nummernaufkleber beschriften.
- Das Liquorröhrchen nach der Zellzählung 20 Min. bei 1000 U/min bei 10°C zentrifugieren (Hettichzentrifuge Rotina 35 R).

- Den zellfreien Überstand mit einer Tropfpipette bis auf einen Rest von ca. 0,2 mL behutsam abheben.
- Der Überstand wird für weitere Untersuchungen an die entsprechenden Arbeitsplätze weitergeleitet (Klinische Chemie, Immunologie).
- Zum Zellsediment wird anschliessend, abhängig von der Zellzahl, 0,2 mL – 12 mL kaltes Kulturmedium gegeben und bei niedriger Frequenz ca. 5 Sek. am mechanischen Rüttler resuspendiert.
- 0,2 mL der Zellsuspension wird in die vorbereiteten Einmal-Spezialküvetten der Zytocentrifuge pipettiert und bei 1000 U/min 10 Min. zentrifugiert (Shandon Cytospin® 4).
- Die Zytospins müssen nach dem Zentrifugieren direkt entnommen werden, da das Fliesspapier des Zytofunnels die Flüssigkeit komplett aufsaugt und die Qualität des Präparates beeinträchtigt. Den Zytospin trocknen lassen.
- Die erstellten Zytospins werden nach dem Trocknen am Sysmex SP-1000i nach Pappenheim angefärbt.
- Anschliessend erfolgt in unserem Hause die mikroskopische Untersuchung am CellaVision®DM96.

Die Wahrscheinlichkeit, im Liquor Tumorzellen zu finden, hängt von der Art des Tumors ab. Sie beträgt für primäre Hirntumore etwa 15 %, für Metastasen 30 – 40 % und für Meningeosen 80 %.

Die Tumorzell Diagnostik richtet sich im Allgemeinen nach folgenden gültigen Malignitätskriterien

- abnorme Grösse und Polymorphie der Zellen und der Kerne
- Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kernes
- Kernhyperchromasie, inhomogene aufgelockerte Chromatinstruktur
- deutliche Nukleolen von verschiedener Grösse und Form
- erhöhte Mitoserate und pathologische mehrpolige Mitosen
- Kernpolymorphie und Kernabsprengungen, Riesenzellen und Kernpolymorphie

Die mikroskopische Beurteilung, Speicherung und Archivierung der Probe erfolgt in unserem Hause am CellaVision®DM96 mit einer speziellen Body Fluid Software, die uns eine 100 %ige Wiederfindung garantiert. Das Präparat wird dabei vollständig gescannt und steht für die Beurteilung komplett zur Verfügung. Besondere Bereiche im Präparat können leicht markiert und somit zu jeder Zeit immer schnell wieder gefunden werden. Es erfolgt eine automatische Vordifferenzierung in segmentkernige Neutrophile, Eosinophile, Lymphozyten, Makrophagen und andere. Weitere Zelltypen können manuell zugeordnet werden.

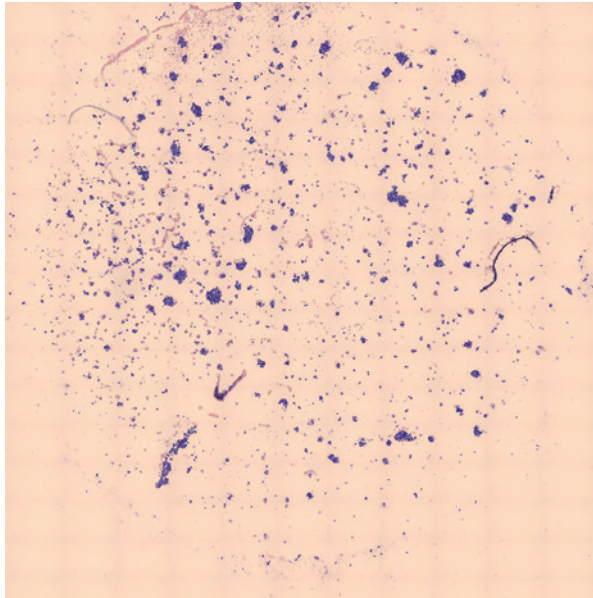


Abb 3 Übersichtsscan des Zytospins am CellaVision®DM96 mit erkennbaren kleinen Zellnestern

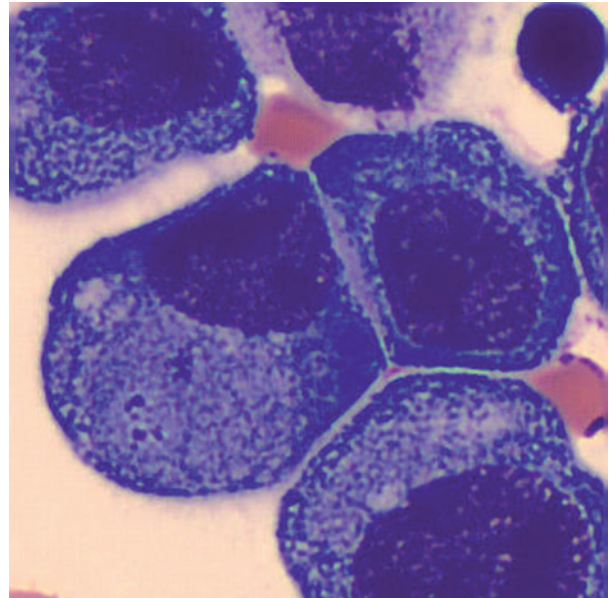


Abb 4 Tumorzellen, die sich in dieser Probe in der Vergrößerung sehr gut erkennen lassen

Liquorstatus – Endbefund

Klinische Angaben	GM-Anfall bei V.a. Meningeosis carcinomatosa, bekanntes Urothelkarzinom. Nachweis von Tumorzellen?	
Punkt. Arzt	Dr. XX	
Punktionsdatum	XX.XX.2010	
Entnahmeort	LP	
Uhrzeit	10:00	

Aussehen

vor Zentrifugation	schwach gelb	
nach Zentrifugation	schwach gelb	Referenzbereiche
Zellzahl	16/μL	< 4
Ery. im Liquor	300/μL	< 100
Glukose im Liquor	28 mg/dL	< 75
Lactat im Liquor	5.17 mmol/L	1.1 – 2.1
Gesamt – Protein im Liquor	596.1 mg/L	150 – 500

Liquorzytologie (MGG-Fbg.)

Präparatebewertung	zellreich, qualitativ gut
Lymphozyten	2 %
Tumorzellen	98 %

In den vorliegenden Präparaten massiver Nachweis von Tumorzellen mit Verdacht auf das bekannte Urothelkarzinom.

Differenzialdiagnose	Meningeosis carcinomatosa
----------------------	---------------------------

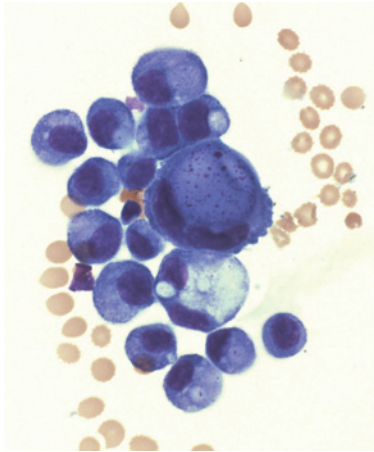


Abb 5 Zytospinpräparat: Gruppe von Tumorzellen

Beurteilung der Proteindiagnostik nach Reiber

Geringgradige Störung des Funktionszustands der Blut-Liquor-Schranke. Kein Hinweis auf eine lokale Immunglobulin-Synthese oder eine oligoklonale Immunreaktion im ZNS. Kein Anhalt auf eine Borreliose oder Neuroborreliose.

Nützliche und hilfreiche Literatur, die wir im Labor verwenden

Deutsche Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie: *Ausgewählte Methoden der Liquordiagnostik und klinischen Neurochemie* (2. Auflage, 2004)

Kluge H., Wieczorek V., Linke E., Zimmermann K., Witte O.W.: *Atlas der praktischen Liquorzytologie*. Thieme Verlag Stuttgart (2005)

Worofka B., Lassmann J., Bauer K., Kristoferitsch W.: *Praktische Liquorzell Diagnostik*. Springer Verlag (1997)

Korrespondenz

Barbara Schroeder, leitende MTA,

Johannes Wesling Klinikum in Minden, Zentrallabor Abteilung Hämatologie. Johannes Wesling Klinikum Zentrallabor

Leitung Prof. Dr. Franz-Josef Schmitz

Abteilung Hämatologie im Zentrallabor

Telefon: 0571 790 54812

Minden