

## 3.5 HÄMATOPATHOLOGIE UND LYMPHOME MOLEKULARPATHOLOGIE

Christine Beham-Schmid, Andreas Chott, Hans Peter Dinges

### A. KNOCHENMARKSBIOPSIEN

**Anweisung:** Zur standardisierten Erfassung der wesentlichen klinischen Daten empfiehlt sich die Herausgabe spezieller Anweisungsformulare oder Beiblätter (aktuelle Beispiele für Beiblätter zu den üblichen Standardanweisungen können bei jedem Autor dieses Standardpapiers angefordert werden).

**Makroskopie:** Länge und Durchmesser der Knochenstanze(n) sind anzugeben. Standard sind mit der Yamshidi-Nadel entnommene Knochenstanzen mit einem Durchmesser von 2 - 3 mm. Stanzen mit weniger als 8 Markräumen von tieferen Regionen sind eingeschränkt beurteilbar oder nicht repräsentativ.

**Aufarbeitung:** Die Fixierung richtet sich nach dem jeweiligen Einbettungsverfahren: Fixierungen in Carnoy'scher Lösung bei Kunststoffeinbettung unentkalkter Proben (Glykolmethacrylat, Methylmethacrylat). Fixierung in Schäfer'scher Lösung bei Paraffineinbettung und nachfolgender schonender Entkalkung in EDTA-Lösung.

Fixierlösung nach Schäfer: 2 ml 25 % Glutaraldehyd + 3 ml Formalin (37 %) + 1,58 g wasserfreies Ca-Acetat ad 100 ml Aqua destillata.

Fixierung der Gewebprobe über 8 - 24 Stunden, danach Auswaschen 30 Minuten in fließendem Wasser und Überführen in EDTA-Lösung. Nach einer Entkalkungsdauer von etwa 72 Stunden Auswaschen in fließendem Wasser, danach Einbringen in aufsteigende Alkoholreihe.

Alternative: Fixierung in modifizierter Schaffer'scher Lösung: 200g Formaldehyd 37% + 800g Äthanol 95%. Fixierdauer 12-48 h, danach 6-12 h in routinemäßig verwendetem Formalin, daran anschließend EDTA-Entkalkung.

Entkalkung: Schonende EDTA-Entkalkung.

Färbungen: Hämatoxylin-Eosin, Giemsa, Eisen (Berliner Blau, Turnbullblau), Faserfärbung (Gomori), PAS; eventuell Knochenfärbung (Ladewig, Goldner, Kossa etc.).

**Immunhistochemie:** An entkalkten, in Paraffin eingebetteten Proben: Leichtketten (kappa und lambda), Schwereketten (IgG, IgM, IgA, IgD), Myeloperoxidase, Tryptase, Hämoglobin, Glycophorin C, bcl-2, bcl-6, tdT, EBV, Alk1, MIB-1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD20, DBA44, CD21, CD34, CD38, CD56, CD57, CD61, CD68-PGM1, CD68-KP1, CD79a, CD117, CD138.

Immunhistochemische Färbeergebnisse sind außerordentlich stark von der gewählten und ordnungsgemäß durchgeführten Fixierung und einer möglichst schonungsvoll durchgeführten Entkalkung abhängig. Positive Kontrollschnitte sollten daher immer mitgeführt werden und gegebenenfalls Variationen des Färbeprotokolls in Betracht gezogen werden (Retrieval, AK-Inkubation etc.).

Für eine exakte Typisierung akuter Leukämien empfiehlt sich die Typisierung am Gefrierschnitt (Gefrierschnitte von Knochenstanzen sind nur in Speziallabors durchführbar) und/oder die FACS-Analyse.

## ÖGP Qualitätsstandards in der Pathologie

**Enzymhistochemie:** Leder'sche Esterasereaktion (Naphtol-AS-D-Chloracetat-Esterase).

**Molekulare Diagnostik:** Molekularpathologische Untersuchungen in der Hämatonkologie nehmen an Bedeutung stetig zu. Sie dienen einerseits der Überprüfung und Ergänzung von histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen, wobei **die PCR-gestützte Klonalitätsanalyse** eine Hauptrolle spielt. Sie ermöglicht den Nachweis einer gegebenenfalls im Biopsiematerial vorliegenden monoclonal expandierten B-Zellpopulation (Immunoglobulinrearrangement) oder T-Zellpopulation (T-Zellrearrangement). Während des Follow-up ist ein frühzeitiges Auftreten oder eine Persistenz der klonalen Zellpopulation evaluierbar. Darüber hinaus können mittels PCR einige krankheitstypische Rearrangements amplifiziert werden, wie etwa eine t(14;18) Translokation beim folliculären Lymphom, und PML/RAR $\alpha$  bei Promyelozytenleukämie. Die angewandte Methode (PCR nach DNA-Extraktion, PCR nach RNA-Extraktion und reverser Transkriptase etc.) und das Ausgangsmaterial (Blut, Knochenmark, paraffineingebetteter Knochenstanzzyylinder) müssen genau beschrieben sein.

Wesentlich breitere Anwendung in der Typisierung hämatopoetischer Neoplasien, speziell von myelodysplastischen und myeloproliferativen Erkrankungen, kommt **molekular-zytogenetischen (FISH) und zytogenetischen Untersuchungen (Karyotypisierung)** zu, die oft in Kombination durchgeführt werden.

**Aspirationszytologie:** Die Diagnostik von Knochenmarksaspiraten und Beckenkammstanz-zylindern sollte am besten in einer Hand liegen, d. h. im selben Labor erfolgen, da sich beide Methoden ergänzen. Für bestimmte Diagnosen und deren Klassifizierung (z. B. Myelo-dysplasien) ist der Aspirationsbefund unerlässlich, andererseits kann der Aspirationsbefund architektonische Besonderheiten nicht erfassen und ist bei manchen Erkrankungen auch nicht erhebbar (z. B. leeres Mark bei Osteomyelofibrose). Liegen die Aspirationszytologie und die Stanzzyylinderhistologie in getrennten Händen, ist ein enger Informationsaustausch ein unabdingbares Erfordernis, gegebenenfalls mit Austausch von Schnitten und zytologischen Präparaten.

**Diagnostische Information:** Mindestanforderung für die histologische Auswertung eines Stanzzyinders ist das Vorhandensein von mindestens 3 bis 5 Markräumen der tiefen Region oder 10 Markraumanteilen. Bei der Befunderstellung sind folgende Parameter zu berücksichtigen: Aufbau und Zustand des Knochengerüsts, Zellularität der Hämoopoese, Zusammensetzung der Hämoopoese (qualitativ und quantitativ), allfällige nicht ortsübliche (pathologische) Zellinfiltrate (Infiltrationsmenge und -form), Eisengehalt und Fasergehalt des Knochenmarkes. Die Diagnosen sind entsprechend der aktuellen Version der WHO-Klassifikation abzufassen.

**Anleitung zur Befundung von Knochenmarksbiopsien:** Folgende Kriterien sollten im Befundbericht Erwähnung finden:

**Länge:** in mm;

**Beurteilbarkeit:** gut, eingeschränkt (durch tangentielle Entnahme oder Fragmentierung etc.), nicht beurteilbar;

**Knochen:** Art des Knochens (kortikal, subkortikal, spongiös), altersgehörig, Umbauzeichen, Osteopenie, Osteosklerose etc.;

## ÖGP Qualitätsstandards in der Pathologie

**Zellularität:** normo-, hypo-, hyperzellulär und der jeweilige Ausprägungsgrad (gering, mittelmäßig, hochgradig);

**Haematopoese:** qualitative und quantitative Beschreibung der einzelnen Kompartimente, i. e. Erythro-, Granulo- und Megakaryopoese.

**Stroma:** Ödem, Fibrose (Grad 1-4), Auftreten von Lymphocyten, Plasmazellen, Mastzellen, Schaumzellen (Histiocyten) etc.;

**Pigmente und andere Substrate:** qualitative und quantitative Erfassung von Pigmenten, Siderin, eisenfreien Pigmenten und anderen Substraten (Glykogen etc.) im Stroma und in den Zellen;

**Neoplastische Infiltration:** Art und Form der Infiltration sowie dessen Ausmaß, Typisierung und Klassifikation nach den WHO-Kriterien.

## B. LYMPHKNOTEN UND EXTRANODALE GEWEBE

**Klinische Angaben:** Alter, Geschlecht, klinische Fragestellung . In einigen Fällen sind konkrete Hinweise für die korrekte Diagnosestellung unverzichtbar, wie z. B. bei einer Posttransplantation-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankung. Die klinischen Angaben sollen folgende speziellen Punkte beinhalten:

- Mitteilung des Vorhandenseins generalisierter oder lokalisierter Lymphknotenschwellungen;
- Organvergrößerungen (Hepato-Spleno-Megalie);
- wesentliche hämatologische Befunde, wie z.B. Lymphozytose, Panzytopenie (Blutbild, Differentialblutbild);
- wesentliche weitere Laborparameter (bekannte Infektionen, Virusnachweise, Helicobakter etc.);
- vorausgegangene Diagnosen lymphatischer Neoplasmen mit Spezifizierung der Daten (Vorbefunde);
- vorausgegangene Immunabnormitäten inklusive kongenitaler Erkrankungen;
- Autoimmunerkrankungen.

**Makroskopie:** Der richtige Umgang mit excidierten Lymphknoten und anderen Biopsaten (aus Magen etc.) ist die unabdingbare Voraussetzung zur Gewinnung von Schnittpräparaten hoher Qualität (2 - 4 µ dicke Schnitte). Es sollte daher jedes Labor in seinem Einzugsbereich entsprechende Empfehlungen herausgeben. Lymphknoten sollten nach Möglichkeit unfixiert und nicht fragmentiert übermittelt werden; keinesfalls uneingeschnitten in Fixierlösung. Für die Standardfixierung empfiehlt sich 10%-ige oder 7,5%-ige, neutral gepufferte Formalin-lösung. Folgendes ist zu beachten und festzuhalten:

- Identifikation der Gewebprobe (Name des Patienten), Zuordnung des Organes und der Lokalisation, Nummerierung;
- es ist festzuhalten, in welchem Zustand das Organ eingelangt ist (frisch, fixiert, intakt oder eingeschnitten);
- und welche chirurgische Vorgangsweise gewählt wurde (Excision, Keilbiopsie, Stanzbiopsie);
- die Größe des Präparates ist durch Abmessung in 3 Dimensionen festzuhalten;
- der Zustand der Organkapsel ist zu beschreiben, auch ihre Intaktheit oder allfällige Veränderungen;

## **ÖGP Qualitätsstandards in der Pathologie**

- weiters Farbe, Konsistenz, Struktur (knotig, diffus), allfällige Nekrosen und Einblutungen.

### **Aufarbeitung des Lymphknotens:**

- Lymphknoten sollten vorzugsweise entlang der Längsachse geteilt werden mit Aufarbeitung beider Hälften des Präparates in ca. 3 mm dicken Scheiben;
- bei unfixierten Lymphknoten sollte eine entsprechende Anzahl an Abklatschpräparaten für Standardfärbungen und Spezialuntersuchungen (z. B. FISH) angefertigt werden;
- bei entsprechender Größe und Zahl der Lymphknoten sollten Gewebeproben in flüssigem Stickstoff am besten nach Vorkühlung in Isopentan (2-Methyl-Butan) schockgefroren in flüssigem Stickstoff oder bei -80°C im Tiefkühlschrank gelagert werden. Die Größe der Gewebeproben sollte 10:10:5 mm nicht übersteigen.
- Die Fixierung des Hauptanteiles des (der) zugeschnittenen Lymphknoten erfolgt in Formalin für 12-24 Stunden. Bei kleinen Proben (z.B. endoskopische Biopsien, Nadelbiopsien) sind auch 6-12 Stunden ausreichend.
- Je nach Größe des Präparates werden unterschiedlich viele Proben fixiert und in Paraffin eingebettet. Als Richtlinie kann gelten: pro 1 cm Durchmesser 1 - 2 Proben;
- die Herstellung möglichst dünner Schnitte ist Voraussetzung für eine sichere Diagnostik (2 - 4 µ Dicke);
- Hämatoxylin-Eosin und Giemsa-Färbungen gelten als Standardfärbungen.

**Aufarbeitung der Milz:** Für die Milz sind in Abänderung bzw. Ergänzung zur geschilderten Vorgangsweise beim Lymphknoten folgende Punkte zu beachten:

- das Organ ist abzumessen (3 Dimensionen) und abzuwiegen;
- Zustand der Kapsel beschreiben;
- fokale Läsionen wie Knoten, Infarkte, Einblutungen etc. sind besonders hervorzuheben, desgleichen Abnormitäten der roten und weißen Pulpa.
- Zunächst sollte die Milz in ca. 1 cm dicke Scheiben geschnitten und nach kurzer Anfixierung (3 - 5 Stunden) schließlich in ca. 3 mm dicken Scheiben aufgearbeitet werden;
- im Falle eines Milzbefalles beim Hodgkin-Lymphom sollte die Zahl der makroskopisch eruierbaren knotigen Infiltrate festgehalten werden.
- Evaluierung der Milzhiluslymphknoten ist für die Gesamtbeurteilung unerlässlich.

### **Diagnostische Informationen:**

- Gewebeart und exakte anatomische Lokalisation sollten festgehalten werden;
- desgleichen die Entnahmeart (Excisat, Keilbiopsat, Stanzbiopsie).
- Die histologische Tumortypisierung hat bei Hodgkin-Lymphomen und Non-Hodgkin-Lymphomen nach der jeweils gültigen Version der WHO-Klassifikation zu erfolgen. Morphologische und/oder klinische Varianten können gesondert angeführt werden.
- Es ist anzuführen, ob ein Präparat (Lymphknoten etc.) komplett oder teilweise vom Neoplasma infiltriert ist;
- bei zusammengesetzten Lymphomen oder Lymphomen in unterschiedlich fortgeschrittener Progression (z.B. bei follikulären Lymphomen) sind diese Umstände in der Diagnose herauszuarbeiten.

## ÖGP Qualitätsstandards in der Pathologie

- Die Beurteilbarkeit der übersandten Gewebsprobe ist festzuhalten. Dies gilt besonders für Fälle mit eingeschränkter oder nicht mehr gegebener Beurteilbarkeit (z. B. komplette Gewebsnekrose bei Stanzbiopsien etc.). Sofern möglich, sollten die Gründe für eine eingeschränkte oder nicht mehr vorhandene Beurteilbarkeit angeführt werden.

### **Immunhistochemische Untersuchungen:**

Eine IHC-Untersuchung ist bei jeder Erstdiagnose eines malignen Lymphoms erforderlich. IHC-Untersuchungen sind in den Befundbericht zu integrieren, alle Antigene sind anzuführen und die Ergebnisse sind kritisch zu werten. Die IHC-Untersuchungen erfolgen heute fast ausschließlich an formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Material. Nur wenn die Vorgangsweise davon abweicht, sind die entsprechenden Umstände (z. B. IHC an gefrorenem Material) besonders hervorzuheben. Im speziellen sollten dem Befundbericht folgende Fakten entnommen werden können:

- alle untersuchten Marker (Epitope), egal ob im Ergebnis positiv, negativ oder nicht beurteilbar;
- alle untersuchten Antigene sollten nach Möglichkeit entsprechend der CD-Nomenklatur angeführt werden. Die Angabe eines entsprechenden AK-Clons oder Firmennamens ist optional, empfiehlt sich aber bei Verwendung verschiedener AK zur Darstellung unterschiedlicher Epitope eines Antigens (z. B. bei den Leichtketten).
- Immunhistochemische Standards wie Art der manuellen Aufarbeitung, Immunfärbeautomaten, Retrieval-Verfahren etc. müssen in Form von schriftlich festgehaltenen Standard-Operation-Procedures (SOP) jederzeit im Labor abgefragt und kontrolliert werden können (siehe auch Standardpapier Immunhistochemie).
- Vermeidung der Angabe allgemeiner Gruppenmarker, wie z. B. B-Zell-Marker, T-Zell-Marker, Pan-Zytokeratin ohne nähere Angabe. Das Antigen (z. B. CD20, CD3) oder die verwendete AK-Präparation (z. B. AE1/AE3) ist anzugeben.
- Die das entsprechende Antigen exprimierende Zellpopulation ist zu beschreiben sowie auch die Intensität und Quantität (Prozentangaben!) der reagierenden Zellpopulation, soweit eine solche Aussage möglich ist.
- Die Bedeutung der Ergebnisse der IHC-Untersuchung für die endgültige Diagnose ist hervorzuheben.

Antikörper zur Darstellung folgender Antigene (Epitope) sollten in jedem Labor, in dem maligne Lymphome in größerer Frequenz befundet werden, vorhanden sein:

CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11c, CD14, CD15, CD20, CD21, CD23, CD25, CD30, CD34, CD38, CD43, CD45RO, CD45RB, CD56, CD57, CD68, CD74, CDw75, CD75a, CD79a, CD138, IgG, IgM, IgA, kappa, lambda, EMA, Pan-Cytokeratin (AE1/AE3 etc), bcl-2, bcl-6, Cyclin D1, MIB-1, S100-Protein, HLA-DR, EBV, tdT, TIA-1, Granzyme B, ALK1, Pax5, OCT2, BOB1.

**Molekulargenetische Untersuchungen:** Die molekulare Diagnostik ermöglicht nützliche Informationen zur Klonalität einer lymphomverdächtigen Infiltration, zur Abstammungsbestimmung einer lymphomatösen Zellpopulation oder Aussagen einer genau definierten genetischen Abnormalität in Verbindung mit einer bestimmten Erkrankung. IHC-Untersuchungen zur Monoklonalität können mit molekularen Methoden ergänzt und abgesichert werden, insbesondere wenn die IHC unklar

## ÖGP Qualitätsstandards in der Pathologie

ausfällt bzw. zu keinem Ergebnis führt. In der Zukunft wird der Nachweis exakt definierter Gendefekte in Zusammenhang mit der Diagnose bestimmter Lymphomentitäten eine immer wichtigere Rolle spielen (follikuläre Lymphome, Mantelzell-Lymphome etc.). Für Pathologien größerer Schwerpunkt-krankenhäuser mit hämatologischen Abteilungen ist daher eine molekulare Diagnostik vor Ort bereits heute ein unverzichtbares Erfordernis.

Folgende Informationen sind im Befund mitzuteilen:

- Art und Zustand der bearbeiteten Gewebsprobe (gefrorenes Material, formalinfixiert und in Paraffin eingebettetes Material etc.);
- die verwendete Methode (PCR nach DNA- oder RNA-Extraktion und Verwendung einer reversen Transkriptase; FISH etc.);
- der verwendete Test ist genauer zu beschreiben, z. B. VJ-PCR zum Nachweis eines IgH-Rearrangement;
- das Ergebnis ist darzustellen (z. B. monoklonale, oligoklonale, polyklonale Bande(n)) und seine diagnostische Relevanz ist in Zusammenhang mit dem dazugehörigen histopathologischen Befund zu diskutieren.

**Referenzbefunde:** Die Diagnostik nodaler und extranodaler maligner Lymphome gehört zu den schwierigsten und am meisten herausfordernden Spezialbereichen in der Histopathologie. Diese Diagnostik bedarf daher großer Erfahrungen und einer bestimmten Einsendefrequenz. Im Einsendegut sind vermehrt kleine Gewebsproben (endoskopische Biopsien, Nadelbiopsien) vertreten, von denen immer detailliertere Informationen gefordert werden. Grundkenntnisse in der Lymphomdiagnostik sollte jeder Facharzt für Pathologie besitzen, doch empfiehlt sich die Durchführung der Lymphomdiagnostik im großen Stil nur durch geübte Pathologen, denen auch die nötigen methodisch/technischen Hilfsmittel (Immunhistochemie, molekulare Diagnostik) zur Verfügung stehen. Die Einholung entsprechender Referenzbefunde bei unklaren und schwierigen Fällen mit kritischer therapeutischer Weichenstellung ist daher auch aus forensischen Gründen dringend zu empfehlen (Lymphomregister existieren an allen drei österreichischen medizinischen Universitäten).

### **Anleitung zur Befundung von Neoplasien des Lymphknotens und in extranodalen Geweben:**

Folgende Kriterien sollten im Befundbericht Erwähnung finden:

**Architektur:** gewahrt, partiell oder komplett aufgehoben etc.;

**Art der Infiltration:** globale Beschreibung der infiltrierenden Zellrasse(n);

**Form der Infiltration:** diffus pseudofollikulär, perifollikulär, intrasinusoidal, nodulär mit Septenbildung (z.B. bei Hodgkin-NS), etc.;

**Kapsel:** zart, verschwielt, infiltriert mit und ohne Infiltration des perinodulären Gewebes etc.;

**Immunhistochemie:** Art und Muster der reagierenden Zellen (sowohl der neoplastischen als auch der reaktiven Zellen) und Angaben über Quantität der immunreaktiven Zellen/ Zellrasse(n) und Intensität der Immunreaktion.

**Diagnose:** entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation mit Kodierung nach ICD-O. Im Diagnosefeld sollten auch Material und Lokalisation angegeben werden.

### Literatur:

## **ÖGP Qualitätsstandards in der Pathologie**

E. S. Jaffe, P.M. Banks, B. Nathwani, J. Said, S. H. Swerdlow: Recommendations for the reporting of lymphoid neoplasms: a report from the Association for Directors of Anatomic und Surgical Pathology. *Virchows Arch* (2002) 441:314-319.

E.S. Jaffe, N.C. Harris, H. Stein, J. W. Vardiman: Tumours of Haematopoietic und Lymphoid Tissues. World Health Organisation Classification of Tumours. IARC Press, Lyon, 2001.