

Dr. G.H.Neckheimstraße 31  
A-9560 Feldkirchen

Telefon: +43 4276 56 30-0 E-mail: ordination@sickvet.at

## Tipps zur Entnahme und Einsendung von Proben zur histologischen Untersuchung

|  |  |
|--|--|
| Vorsicht bei der Probenbehandlung                                  | Seien sie vorsichtig bei der Probenentnahme und –behandlung damit keine feingeweblichen Strukturen zerstört werden.  |
| Elektrotome meiden   | Bedenken Sie, dass eine Anwendung von Elektrotomen zu Artefakten im Gewebe führt. Das gleiche gilt für das Tiefgefrieren von Gewebeproben.   |
| Zur Fixation 5 – 10%-iges Formalin verwenden                       | Zur Fixation von Gewebeproben eignet sich 5-10 %-iges Formalin am besten. Alkohol sollte nicht verwendet werden, dieser führt zu Gewebeatefakten. Bedenken sie auch, dass native Einsendungen meist auf Grund der Übermittlungsdauer eine Autolyse des Gewebes bedingen. Das Verhältnis Probenmaterial zu Formalin sollte 1:10 nicht unterschreiten. |
| Kantenlänge der Probe max. 1 cm oder ggf. Probe öfters eischneiden | Optimalerweise sollte die Kantenlänge der Probe wegen einer optimalen Fixierung 1 cm nicht überschreiten. Größerer Proben sollten zumindest öfters angeschnitten werden, um dem Fixationsmedium eine bessere Penetration zu gewährleisten.   |
| Repräsentative Menge an Proben entnehmen                           | Wichtig ist ein repräsentatives Spektrum an Proben, die die relevanten Läsionen enthalten. Nur so kann eine verlässliche histologische Diagnose gestellt werden.   |
| Ein detaillierter klinischer Vorbericht ist wichtig                | Ein detaillierter klinischer Vorbericht (der auch das Signalement des Tieres umfassen muß) ist unerlässlich bei der Einsendung von histologischen Proben. Die Kenntnis des klinischen Bildes und des Krankheitsverlaufs erlaubt es dem Pathohistologen, mögliche Differentialdiagnosen entsprechend zu gewichten.                                    |
| Ggf. Kontaktaufnahme mit dem Labor                                 | Eine Abklärung spezieller Fragestellungen verlangt manchmal besondere Anforderungen an das Probenmaterial bzw. an das Fixiermedium. Bei offenen Fragen oder Unklarheiten diesbezüglich sollte immer vor der Einsendung mit dem Labor Kontakt aufgenommen werden.   |
| Transportbestimmungen beachten                                     | Beim Versand histologischer Proben sind die Transportbestimmungen der Post bzw. der privaten Transportdienste unbedingt einzuhalten (siehe dazu die entsprechenden Broschüren der Post bzw. der Transportdienste).   |

## Tumorhistologie

- Nach Möglichkeit immer die gesamte Probe zur Untersuchung einsenden.
- Große Proben nicht in ein zu kleines Gefäß stecken. Entweder aus der Probe genügend kleine Gewebestücke mit einer Kantenlänge von ca. 1 cm entnehmen oder eventuell die Probe öfters anschneiden, um die Perfusion des Fixatives zu ermöglichen.
- Bei Teileinsendungen (bei sehr großen Tumoren) genügend viele repräsentative Proben aus unterschiedlichen Lokalisationen entnehmen.
- Zur Beurteilung von Schnitträndern: Es ist zu bedenken, dass nur der Nachweis von Tumorgewebe im Bereich der Schnittränder beweisend ist. Der Umkehrschluß, der fehlende Nachweis von Tumorgewebe in den Schnittrandbereichen spräche für eine sichere vollständige Entnahme des Tumorgewebes ist nicht zulässig. Es besteht auch bei der Beurteilung von mehreren Schnittebenen immer die Gefahr, dass einzelne Tumorbereiche nicht erfasst werden, außerdem bilden bestimmte Tumoren Satellitenherde aus, die u. U. weiter entfernt vom Tumorzentrum lokalisiert sind. Die histologische Diagnose einer vollständigen Entfernung ist folglich immer nur eine Wahrscheinlichkeitsdiagnose.

## Hauthistologie

Eine histologische Untersuchung von Hautbiopsien sollte in folgenden Fällen ins Kalkül gezogen werden:

- Wenn die Therapie nicht anspricht
- Wenn rasch Rezidiven der Hauterkrankung auftreten
- Wenn sich das klinische Bild ungewöhnlich / außergewöhnlich darstellt
- Wenn eine tumoröse Erkrankung nicht sicher ausgeschlossen werden kann

Geeignete Lokalisationen auswählen

- Wählen sie nach Möglichkeit frische Primärläsionen zur Biopsie aus. Sekundärläsionen, dazu zählen v. a. Krusten und Ulzera sind diagnostisch in den meisten Fällen nicht aussagekräftig.

Anzahl der Proben

- Sie sollten nach Möglichkeit immer mehrere Proben (mindestens 4) aus verschiedenen Lokalisationen entnehmen. Dadurch wird die Chance auf eine qualitativ hochwertige Diagnose deutlich angehoben, da es dem Pathohistologen erlaubt, ein besseres histologisches Gesamtbild der Hauterkrankung zu erlangen. Nach Absprache mit dem Pathohistologen kann es auch sinnvoll sein, eine Probe aus einer unveränderten Region miteinzusenden.

Entnahmemethoden

- In der Regel werden Rundstanzbiopsien mit einem Durchmesser von 6 oder 8mm zur Entnahme von Hautbiopsien verwendet. Für spezielle Lokalisationen (Nasenspiegel, Ballen,...) oder für sehr kleine Tiere kann die Verwendung einer 4mm Stanze sinnvoller sein. Bei großflächigen Läsionen können auch chirurgische Keilexzisionen entnommen werden, wobei hier auch unveränderte Haut miterfasst bzw. eine Läsion gleich komplett entfernt werden kann. Eine Vorbehandlung der Haut vor der Entnahme wird nicht empfohlen, im Speziellen sollten eine Desinfektion und ein Schrubben der Entnahmestelle vermieden werden um oberflächlich Läsionen nicht zu entfernen. Zu lange Haare können durch einen Scherenschlag gekürzt werden. Lassen sie aber unbedingt ein paar mm Haare stehen, diese

erleichtern dem Pathologen die Orientierung der Probe bei der Aufarbeitung. Die Proben können in Vollnarkose oder (wie zumeist praktiziert) in lokaler Anästhesie entnommen werden. Verwenden sie dabei ein Lokalanästhetikum OHNE Sperrkörper, damit das histologische Bild nicht verfälscht wird. Behandeln Sie die Proben während und nach der Entnahme sehr detaillierten klinischen Vorberichts extrem wichtig. Dieser erlaubt dem Pathohistologen eine eingehende Interpretation und Diskussion des histologischen Bildes unter Bezugnahme auf die Klinik.

## **Zytologische Proben**

Bedenken Sie, dass die mittels der zytologischen Untersuchung kein Gewebeaufbau sondern Einzelzellen beurteilt werden. Ziel ist es, eine klinische Diagnose zu ermöglichen, zu erleichtern, zu präzisieren oder abzusichern – je nach Fragestellung und Fall.

Die Methode der Probenentnahme richtet sich dabei nach den jeweiligen Veränderungen und nach deren Lokalisation. Die Feinnadelaspiration, die Aspiration von Flüssigkeiten, Abklatsche, Abschabungen, Spülungen und Tupferpräparationen bzw. die Verwendung von Spezialbürsten sind dabei die gängigsten praktizierten Methoden. Auf die Spezialliteratur bzw. auf das als Download zur Verfügung stehende Merkblatt wird verwiesen.

Einige nützliche Tipps zu der Entnahme und Einsendung zytologischer Proben sind hier zusammenfassend angeführt:

### 1) Präparationstechniken **„Einfacher“ Ausstrich**

Die Ausstrichstechnik, wie sie zur Herstellung eines Blutausstriches praktiziert wird, kann immer dann verwendet werden, wenn genügend Zellen vorhanden sind (<1000/µl) oder die Flüssigkeit getrübt ist und die Viskosität etwa der von Blut entspricht.

### **Ausstrich mit Stoplinie (Line Smear)**

Diese Technik wird angewandt, wenn nur wenige Zellen in der Flüssigkeit vorhanden sind. Sie stellt eine einfachere Anreicherungstechnik dar, bei der der zum Ausstrich verwendete Objektträger im Gegensatz zur Blutausstrichstechnik nicht bis zum Ende durchgezogen sondern im letzten Drittel der Ausstrichstrecke vom unteren Objektträger im 90 Grad Winkel abgehoben wird.

### **Quetschpräparat (Squash)**

Diese Technik wird am häufigsten zur Beurteilung von Feinnadelpunktaten angewandt. Das Punktat wird auf einen (oder mehrere) Objektträger ausgeblasen. Ein zweiter Objektträger wird parallel oder im Winkel von 90° auf den ersten gelegt und unter sanftem Druck auseinandergesogen (Abb. 3). Meist befindet sich auf beiden Objektträgern genügend Material zur Beurteilung.

### **Abklatschpräparat (Imprint)**

Die Herstellung von Abklatschpräparaten kann auf zwei Arten erfolgen. Die eine Möglichkeit besteht darin, einen Objektträger vorsichtig auf einer veränderten Stelle abzurollen. Dies geschieht am besten vor und nach einer Reinigung der veränderten Stelle. Auch chirurgische Ränder können nach der Exzidation von Malignomen auf diese Weise kontrolliert werden. Als zweite Möglichkeit können exzidierte Gewebestücke nach dem Abtupfen auf einer saugfähigen Unterlage (z. B. Küchenrolle) direkt auf Objektträger gedrückt werden. Die Größe der Stücke soll ½ cm nicht übersteigen, es sollten mehrere Abklatsche auf einem Objektträger angefertigt werden.

## Tupferpräparat

Tupferpräparate sind für die Untersuchung von Sekreten und Exkreten geeignet. WICHTIG: Der Tupfer wird auf dem Objektträger nicht ausgestrichen, sondern vorsichtig in eine Richtung ausgerollt. Der Tupfer darf nicht zu feucht sein.

## Abschabung (Scraping)

Eine Abschabung sollte dann angewendet werden, wenn:

- ein Abklatsch aus technischen Gründen nicht möglich ist (z. B. Mundhöhle, Konjunktiven)
- bei schlecht exfolierenden Tumoren (vor allem mesenchymale Tumore wie z. B. Fibrosarkome)
- bei oberflächlichen Tumoren, wo bei Anwendung der Feinnadelaspirationstechnik die Gefahr des Durchstechens des Tumors besteht.

Von einer gereinigten Körperoberfläche oder trockengetupften Schnittfläche wird mit einer senkrecht zur Oberfläche gehaltenen Skalpellklinge Material abgeschabt, indem die Klinge mehrmals in eine Richtung geführt wird. Das gewonnene Material wird gegen die Richtung der Skalpellschneide auf mehreren Objektträgern ausgestrichen, alternativ kann die Quetsch-Technik angewandt werden.

### 2) Trocknung und Fixation

Die Objektträger werden staubgeschützt für mindestens ½ Stunde OHNE Deckgläschen luftgetrocknet. Eine Fixation durch Eintauchen in Methylalkohol ist nicht notwendig, diese wird bei den Romanowsky-Färbungen unmittelbar vor dem Färben durchgeführt.

### 3) Färbemethoden

**Färbungen vom Romanowsky-Typ** (z. B. May-Grünwald-Giemsa, Diff-Quik® oder Hemacolor®).

#### **Methylenblaufärbung**

**Andere Färbemethoden** (Sudanrot III, Gram)

### 4) Herstellung eines Dauerpräparates

Zur Aufbewahrung sollten zytologische Präparate eingebettet und eingedeckt werden. Dazu eignen sich spezielle Eindecklacke, wie z. B. Entelan®.

### 5) Versand von zytologischen Proben

Für eine externe Untersuchung von zytologischen Proben werden nach Möglichkeit zwei oder mehrere luftgetrocknete Präparate OHNE Deckglas eingesandt.

Für den Versand der Objektträger sind eigene Versandbehälter erhältlich, ungeschützte Objektträger erreichen mit Sicherheit nicht unbeschädigt ihren Bestimmungsort!

### 6) Fehlermöglichkeiten

In der folgenden Tabelle sind eine Reihe wichtiger Fehlermöglichkeiten bei der Präparation und beim Versand zusammengestellt, die dazu führen, dass ein korrekt entnommenes zytologisches Präparat nicht beurteilbar wird.

| Fehlermöglichkeit   | Auswirkung                               |
|---|--|
| Objektträger werden feucht (oder ungenügend getrocknet) mit der Schichtseite nach innen zusammengeklebt | Zellen werden völlig zerstört (Autolyse) |
| Objektträger werden feucht mit Deckglas versehen  | Zellen werden völlig zerstört (Autolyse) |

|  |   |
|--|---|
| Ausstrich viel zu dick (Punktat wird nur aufgebracht, Probe wird nur ungenügend ausgestrichen, etc.) | Einzelzellen oft nicht beurteilbar.   |
| Feinnadelpunktat verbleibt zulange in der Nadel oder wird mit der Nadel versandt                     | Präparat trocknet ein   |
| Abschabung bleibt auf der Skalpellklinge   | Präparat trocknet ein   |
| Punktat wird in einem ungeeigneten Röhrchen versandt (z.B. Serumröhrchen anstelle von EDTA)          | Zellen verklumpen oder gehen zugrunde   |
| Präparat überfärbt   | Kern- und Plasmadetails nicht beurteilbar (kann entfärbt werden, falls nicht eingedeckt)                                |
| Probe auf vorgefärbten Objektträger (z.B. Testsimplets®) wird versandt                               | Gut für rasche Übersicht (entspricht einer Vitalfärbung), nach dem Eintrocknen unbrauchbar, kann nicht entfärbt werden. |