

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Studie zur Bestimmung präanalytischer Einflussfaktoren auf
die Liquorzellstabilität

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anja Osterloh

aus Sangerhausen

Datum der Promotion: 25.11.2022

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung / Abstract	
1. Zusammenfassung	Seite 1
2. Abstract	Seite 3
II. Einleitung	Seite 5
III. Material und Methodik	
1. Material	Seite 14
2. Zytologische Beurteilung	Seite 17
3. Datenerhebung und statistische Auswertung	Seite 19
IV. Ergebnisse	
1. Einfluss der Zeit	Seite 20
2. Einfluss der Umgebungstemperatur	Seite 22
3. Einfluss des Transportbehältnisses	Seite 26
4. Einfluss des Eiweiß-, Glucose- und Lactatgehalts	Seite 28
5. Einfluss der manuellen Handhabung	Seite 29
6. Variabilität in Abhängigkeit vom Präparat	Seite 31
7. Variabilität in der Befundung	Seite 33
V. Diskussion	Seite 35
VI. Literaturverzeichnis	Seite 42
VII. Anhang	
1. Erhebungsbogen	Seite 49
2. Eidesstattliche Versicherung	Seite 50
3. Lebenslauf	Seite 52
4. Danksagung	Seite 53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Ablauf der Liquorzytologie mit möglichen Fehlerquellen	Seite 13
Abbildung 2:	Probeneinschluss	Seite 15
Abbildung 3:	Über das Standardprogramm hinausgehende Prozessierung und Beurteilung	Seite 16
Abbildung 4:	intakte Zellelemente (von links nach rechts: aktivierter Lymphozyt, neutrophile Granulozyten, epitheliale Tumorzellen)	Seite 18
Abbildung 5:	autolytische Zellelemente (von links nach rechts: Monozyt; neutrophile Granulozyten; epitheliale Tumorzelle)	Seite 18
Abbildung 6:	Zellschatten (links; Mitte) und artifizielle Zellelemente (rechts)	Seite 18
Abbildung 7:	Erhaltungszustand von 36 Liquorproben in der 1., 2. und 3. Stunde nach Abnahme	Seite 20
Abbildung 8:	Darstellung des Anteils an intakten Zellen von 119 Liquorproben in Abhängigkeit von der Tageshöchsttemperatur	Seite 22
Abbildung 9:	Darstellung des Anteils an autolytischen Zellen von 119 Liquorproben in Abhängigkeit von der Tageshöchsttemperatur	Seite 22
Abbildung 10:	Darstellung des Anteils an Zellschatten von 119 Liquorproben in Abhängigkeit von der Tageshöchsttemperatur	Seite 23
Abbildung 11:	Darstellung des Anteils an intakten und Autolytischen Zellen sowie Zellschatten von 119 Liquorproben in 2 Gruppen (Tageshöchsttemperatur < 30°C; Tageshöchsttemperatur > 30°C)	Seite 24

Abbildung 12:	Darstellung des Erhaltungszustandes von 35 schonend transportierten Liquorproben (Box) und 35 konventionell transportierten Liquorproben (Kurier)	Seite 26
Abbildung 13:	Darstellung des Anteils an Zellschatten von 83 Liquorproben in Abhängigkeit vom Eiweißgehalt (links) und vom Lactatgehalt (rechts)	Seite 28
Abbildung 14:	Darstellung des Anteils an intakten und autolytischen Zellen sowie an Zellschatten von 16 Liquorproben in Abhängigkeit von der manuellen Handhabung in Labor 1 (Labor 1) und Labor 2 (Labor 2)	Seite 29
Abbildung 15:	Von 54 Liquorproben wurde der Anteil an intakten Zellen von jeweils 2 zeitgleich angefertigten Zytospinpräparaten verglichen.	Seite 31
Abbildung 16:	Von 54 Liquorproben wurde der Anteil an Zellschatten von jeweils 2 zeitgleich angefertigten Zytospinpräparaten verglichen.	Seite 31
Abbildung 17:	Anteil intakter Zellen von 17 Zytospinpräparaten ermittelt durch Befunder 1 und Befunder 2	Seite 33
Abbildung 18:	Anteil an Zellschatten von 17 Zytospinpräparaten ermittelt durch Befunder 1 und 2	Seite 33

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Erhaltungszustand von 36 Liquorproben in der 1., 2. und 3. Stunde nach Abnahme	Seite 20
Tabelle 2:	Von 119 Liquorproben wurde der Erhaltungszustand der Zellen mit der maximalen Außentemperatur am Tag der Abnahme korreliert.	Seite 23
Tabelle 3:	119 Liquorproben wurden in 2 Gruppen (Tageshöchsttemperatur < 30°C; Tageshöchsttemperatur > 30°C) hinsichtlich des Erhaltungszustandes der Zellen miteinander verglichen.	Seite 24
Tabelle 4:	35 schonend (in einer Styroporbox) transportierte Liquorproben wurden mit 35 konventionell (Kurier) transportierten Proben hinsichtlich des Erhaltungszustandes der Zellen verglichen.	Seite 26
Tabelle 5:	Von 83 Liquorproben wurden der Anteil an intakten Zellen und Zellschatten mit dem Glucose-, Lactat- und Eiweißgehalt korreliert.	Seite 28
Tabelle 6:	Von 16 Liquorproben wurden zeitgleich in 2 Verschiedenen Laboren Zytospinpräparate angefertigt und diese hinsichtlich des Erhaltungszustandes der Zellen miteinander verglichen.	Seite 29
Tabelle 7:	Von 54 Liquorproben wurden zeitgleich 2 Zytospinpräparate angefertigt und hinsichtlich des Erhaltungszustandes der Zellen verglichen.	Seite 32
Tabelle 8:	17 Zytospinpräparate wurden durch 2 Befunder Unabhängig voneinander hinsichtlich des Anteils an intakten Zellen und Zellschatten begutachtet und die Ergebnisse korreliert.	Seite 34

I. Zusammenfassung / Abstract

I.1 Zusammenfassung

Einführung: Die exakte Differenzierung der Zellen im Liquor cerebrospinalis ist im Rahmen der diagnostischen Aufarbeitung insbesondere bei neurologischen Krankheitsbildern und Tumorerkrankungen unerlässlich und setzt einen guten Erhaltungszustand der Zellen voraus. Liquor cerebrospinalis gilt als sensibles Probenmaterial, welches bereits 2 Stunden nach Entnahme deutliche autolytische Veränderungen zeigt. Im Institut für Neuropathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin fiel bei der Beurteilung von jährlich über dreitausend Liquorproben ein sehr variabler Erhaltungszustand der Zellen auf. Die große Variabilität im Erhaltungszustand war dabei nicht ausschließlich durch die Dauer des Probenverkehrs zu erklären. Die manuelle Handhabung der Proben im Labor sowie hohe Außentemperaturen schienen einen negativen Einfluss zu haben. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Beobachtungen objektiviert und relevante präanalytische Einflussfaktoren auf den Erhaltungszustand der Zellen identifiziert.

Methodik: Insgesamt wurden Liquorproben von 119 Patient*innen eingeschlossen und hinsichtlich des Erhaltungszustandes der darin enthaltenen Zellen beurteilt. Dafür wurden Zytospinpräparate angefertigt, nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa) gefärbt und am Mikroskop beurteilt. Untersucht wurde der Einfluss der Zeit zwischen Probenabnahme und Anfertigung der Zytospinpräparate, der Einfluss des Transportbehältnisses und der Umgebungstemperatur, der Einfluss der manuellen Handhabung im Labor sowie des Gehalts an Eiweiß, Glucose und Lactat. Auch die Variabilität innerhalb einer Probe und in der mikroskopischen Beurteilung wurden erfasst.

Ergebnisse: Es zeigten sich eine statistisch signifikante inverse Korrelation der Tageshöchsttemperatur zu dem Anteil intakter Zellen. Bei Tageshöchstwerten über 30°C war zusätzlich der Anteil an Zellschatten signifikant gesteigert. Darüber hinaus war ein signifikanter Einfluss der manuellen Handhabung der Proben auf den Erhaltungszustand der Zellen nachweisbar. Ein relevanter Einfluss der übrigen untersuchten Faktoren zeigte sich hingegen nicht.

Schlussfolgerungen: Zusammenfassend lassen sich einzelne Empfehlungen ableiten, welche zu einer besseren Beurteilbarkeit von Zytospinpräparaten im Institut für Neuropathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin beitragen können. Das Labor, in welchem die Zytospinpräparate angefertigt werden, sollte jederzeit mit ausreichend Personal besetzt sein, um eine unmittelbare und gewissenhafte Bearbeitung der Liquorproben zu ermöglichen. Auch sollte das Laborpersonal im Umgang mit Liquor gut und regelmäßig geschult werden. Darüber hinaus muss es vermieden werden, den Liquor hohen Umgebungstemperaturen auszusetzen, sodass sich an heißen Tagen eine Kühlung der Proben während des Transports empfiehlt.

I.2 Abstract

Introduction: The exact differentiation of the cells in the cerebrospinal fluid (CSF) is of great relevance within the diagnostic process, especially in the context of neurological diseases and tumor diseases, and thus requires a good state of preservation of the cells. CSF is a sensitive material that shows significant autolytic changes just 2 hours after collection. In the Department of Neuropathology at the Charité - Universitätsmedizin Berlin, the assessment of over three thousand CSF samples per year revealed a great variety of the state of preservation of the cells which could not only be explained by the duration of the sample transportation. The handling of the samples by the technical staff in the laboratory as well as high outside temperatures also seemed to have a negative impact. This led to the questions if these observations could be confirmed and if some preanalytic factors show a higher influence on the condition of the cells than others.

Methods: 119 CSF samples were included and assessed with regard to the state preservation of the cells. For this purpose, cytospins were prepared and assessed under the microscope. The influence of delayed cytopsin preparation, the transport container and the ambient temperature, as well as the influence of handling by the technical staff as well as the protein, glucose and lactate levels were examined. The variability within one sample and between two assessors was also documented.

Results: There was a statistically significant inverse correlation between the maximum daily temperature and the proportion of intact cells. Additionally, the proportion of cell shadows was also significantly increased with outside temperatures above 30 degrees. Moreover, a significant influence of the handling of the samples by the technical staff on the preservation of the cells could be demonstrated. However, there was no further relevant influence of the other examined factors.

Conclusions: The results of the present work are helpful to identify factors that can lead to an improved assessment of cytospins in the Department of Neuropathology of the Charité - Universitätsmedizin Berlin. One conclusion is that the laboratory in which the cytospins are prepared should be sufficiently staffed at all times to enable immediate and conscientious processing of the samples. Furthermore, the laboratory staff should

also be well and regularly trained in handling CSF samples. In addition, CSF samples should not be exposed to high ambient temperatures. On hot days, cooling of the samples during transportation is advisable.

II. Einleitung

Im Institut für Neuropathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin werden jährlich über dreitausend Liquorproben sowohl von den verschiedenen Standorten der Charité als auch von externen Einsendern in Form von sogenannten Zytospinpräparaten mikroskopisch beurteilt und befundet. Dabei ist ein sehr variabler Erhaltungszustand der zellulären Bestandteile der Liquorproben zu beobachten. Ein relativ großer Anteil der eingesandten Präparate ist aufgrund fortgeschrittener autolytischer Veränderungen nur noch eingeschränkt oder nicht mehr sicher beurteilbar. Im Rahmen der Qualitätsüberwachung fiel auf, dass die große Variabilität im Erhaltungszustand der Zellen überwiegend nicht durch die Dauer des Probenverkehrs zu erklären ist. Ein großer Anteil der eingeschränkt oder nicht mehr beurteilbaren Proben hatte das Labor innerhalb des vorgegebenen Zeitraums von 2 Stunden nach Abnahme erreicht. Innerhalb der betrachteten Stichproben konnte wiederholt gezeigt werden, dass der Anteil an eingeschränkt oder nicht mehr sicher beurteilbaren Präparaten in Abhängigkeit vom Ort der Liquorpunktion unterschiedlich groß war. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass die manuelle Handhabung der Proben in dem Labor, welches die Zytospinpräparate anfertigt, trotz einheitlichem Protokoll zur Anfertigung von Zytospinpräparaten, ein relevanter Faktor für den Erhaltungszustand der Zellen ist. Auffällig war darüber hinaus ein höherer Anteil an nicht oder nur eingeschränkt beurteilbaren Proben an besonders heißen Tagen. Diese Beobachtungen zu objektivieren und den Einfluss weiterer präanalytischer und analytischer Faktoren auf den Erhaltungszustand der Zellen im Liquor zu untersuchen, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Liquor cerebrospinalis, welcher auch als Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) oder umgangssprachlich als Nervenwasser bezeichnet wird, ist eine klare Flüssigkeit, die die inneren Liquorräume (Hirnventrikel und Zentralkanal des Rückenmarks) und die äußeren Liquorräume (Subarachnoidalraum) ausfüllt. Der Liquor dient insbesondere der Polsterung des zentralnervösen Gewebes und verhindert Schäden durch physikalische Einflüsse wie ein Anprallen an den knöchernen Umgebungsstrukturen. Darüber hinaus fungiert die Cerebrospinalflüssigkeit als Transportmedium für Nährstoffe und Abfallprodukte. Der Liquor wird in den Hirnventrikeln durch den Plexus choroideus gebildet. Innere und äußere Liquorräume kommunizieren im Bereich der hinteren

Schädelgrube über die Foramina Luschkae und das Foramen Magendii miteinander. Im Bereich der harten Hirnhaut (Dura mater) wird der Liquor durch Ausstülpungen der Arachnoidea mater, sogenannte Pacchioni-Granulationen, in die venösen Blutleiter der Dura mater (Sinus durae matris) resorbiert. Pro Tag werden bei Erwachsenen etwa 400 – 600 ml Liquor gebildet und resorbiert, das gesamte Liquorvolumen von durchschnittlich 150 – 160 ml wird täglich drei- bis fünfmal erneuert (1; 2; 3).

Die ersten wissenschaftlichen Veröffentlichungen zur Entnahme von Liquor cerebrospinalis stammen aus dem Jahr 1891 (4; 5). Essex Wynter entlastete den Hydrocephalus von Patienten mit tuberkulöser Meningitis mittels Paracentese. Heinrich Irenäus Quincke führte Lumbalpunktionen ebenfalls zur Entlastung eines Hydrocephalus durch. Darüber hinaus analysierte Quincke als einer der Ersten die Zusammensetzung des Liquors, bestimmte die Zellzahl und den Gesamteiweißgehalt der Proben und wies Bakterien nach (6).

Die Untersuchung von Liquor cerebrospinalis ist ein wichtiges Element der diagnostischen Aufarbeitung insbesondere bei neurologischen, psychiatrischen und neurochirurgischen Krankheitsbildern (7). Entzündliche Erkrankungen des Gehirns, der Hirnnerven, des Rückenmarks und der Spinalnerven sowie der umgebenden Hirn- und Rückenmarkshäute müssen mittels Liquoruntersuchung gesichert oder ausgeschlossen werden. Der klinische Verdacht auf eine akute bakterielle Meningitis beispielsweise kann in der Mehrheit der Fälle durch einen typischen Liquorbefund bestätigt werden. Nachweisbar sind eine granulozytäre Pleozytose mit mehr als 1000 Zellen/ μ l, eine stark erhöhte Eiweißkonzentration ($>1000\text{mg/l}$), ein Lactat-Anstieg ($>3,5\text{ mmol/l}$) und ein Glucose-Abfall (Liquor/Serum-Glucose-Quotient $<0,3$) (8). Darüber hinaus wird der Erreger der Meningitis im Liquor nachgewiesen, entweder direkt in einem Gramgefärbten zytologischen Präparat oder mittels kultureller Anzucht, Antigenschnelltest oder Multiplex-PCR (9; 10; 11). Auch zur Sicherung der Diagnose bei Verdacht auf autoimmun-entzündliche Erkrankungen, allen voran der Multiplen Sklerose, ist die Untersuchung von Liquor cerebrospinalis essentiell. Neben dem veränderten Zellbild mit vermehrtem Nachweis von aktivierten Lymphozyten und Plasmazellen ist insbesondere der Nachweis einer intrathekalen IgG-Synthese in Form sogenannter oligoklonaler Banden wegweisend (12; 13).

Die Bedeutung der Liquorzytologie, d. h. die mikroskopische Differenzierung der zellulären Bestandteile des Liquors in zytologischen Präparaten, ist in der Abklärung von Subarachnoidalblutungen und von neoplastischen Erkrankungen mit diffuser Aussaat von Tumorzellen in die Liquorräume (Meningeosis neoplastica) besonders hervorzuheben. Subarachnoidale Blutungen, welche mit atypischen Symptomen einhergehen, computertomografisch nicht nachweisbar oder nicht mehr frisch sind, können mithilfe zytologischer Untersuchungen sicher diagnostiziert werden. Dies ist zwingend notwendig, da das Risiko von Rezidivblutungen hoch ist und die Morbidität und Mortalität bei verzögerter Therapie eines ursächlichen Aneurysmas erheblich ansteigen (14). Darüber hinaus ist anhand des Zellbildes und des Nachweises von Abbauprodukten des Hämoglobins eine Altersschätzung von Subarachnoidalblutungen möglich. Der Nachweis von Erythrophagen spricht dabei für eine frische Blutung, der Nachweis von Hämosiderophagen für eine subakute Blutung und der Nachweis von Hämatoidin für eine bereits ältere Blutung. Mischformen sind hinweisend auf eine mehrzeitige oder anhaltende Blutung (15; 16). Zur Sicherung der Diagnose einer Meningeosis neoplastica, welche bei circa 10 % der malignen Erkrankungen auftritt und spezifische therapeutische Maßnahmen erfordert, stellt die Liquorzytologie den Goldstandard dar. Eine Zellzahl im Normbereich schließt dabei eine Meningeosis neoplastica nicht aus und andere Parameter, beispielsweise eine Lactat- oder Ferritin-Erhöhung, sind unspezifisch (17). Der sichere Nachweis einer einzelnen Tumorzelle im zytologischen Präparat hingegen rechtfertigt die Diagnose einer Meningeosis neoplastica. Dies ist für in der Liquorzytologie geschulte und erfahrene Befunder*innen überwiegend und insbesondere bei Aussaat von Karzinomzellen problemlos möglich und unterstreicht die herausragende Bedeutung der Zytologie in diesem Kontext (18).

Die Untersuchung von Liquor cerebrospinalis ist daher eine häufig angewandte diagnostische Methode in Notaufnahmen und im stationären Bereich (19). Aber auch im ambulanten Sektor gewinnt die Lumbalpunktion an Bedeutung und kommt beispielsweise in Gedächtnisambulanzen zur Abklärung von demenziellen Erkrankungen zum Einsatz (20; 21).

Die Liquorpunktion erfolgt in der Regel am sitzenden Patienten über einen lumbalen Zugangsweg. Dabei wird eine Punktionsnadel zwischen den Dornfortsätzen der 3. und 4. oder der 4. und 5. Lendenwirbelkörper in den Subarachnoidalraum eingeführt, da in

diesem Bereich die Gefahr das Rückenmark zu verletzen minimal ist. Soll zusätzlich der Liquordruck gemessen werden, erfolgt die Abnahme im Liegen (22). In jedem Fall muss steril gearbeitet werden um das Risiko einer iatrogenen Infektion so gering wie möglich zu halten (23). Unter Beachtung der Kontraindikationen – insbesondere sind hier ein erhöhter Hirndruck, eine Blutgerinnungsstörung und Infektionen im Punktionsbereich zu nennen – kommt es im Rahmen von Lumbalpunktionen äußerst selten zu schwerwiegenden Komplikationen (24). Eine relativ häufige, jedoch meist harmlose Komplikation stellt der Postpunktionskopfschmerz dar (25). Ebenfalls kann eine Liquorprobe über einen Ventrikelkatheter sowie einen subokzipitalen Zugang entnommen werden. Die subokzipitale Punktion wird jedoch nur in begründeten Ausnahmefällen angewandt, da sie zu schwerwiegenden Komplikationen führen kann (26).

Neben Punktionen der Liquorräume aus rein diagnostischen Gründen kann eine Liquorpunktion auch mit therapeutischem Ansatz erfolgen. Beispiele hierfür sind Entlastungspunktionen im Rahmen eines Normaldruckhydrozephalus (27) oder einer idiopathischen intrakraniellen Hypertension (28). Darüber hinaus werden Punktionen der Liquorräume zur intrathekalen Applikation von Medikamenten und Kontrastmitteln sowie im Rahmen anästhesiologischer Verfahren durchgeführt.

Die Liquordiagnostik setzt sich aus mehreren Bausteinen zusammen, das Standardprogramm umfasst dabei die Akutparameter, die Proteindifferenzierung sowie die Zytologie. Im Rahmen eines Notfallprogramms werden die Akutparameter erhoben, welche die Zellzahl, den Gesamteiweißgehalt, den Lactatgehalt und den Liquor/Serum-Glucose-Quotienten umfassen. Zusätzlich erfolgt im Notfallprogramm die visuelle Inspektion der Probe und die zytologischen Präparate werden angefertigt.

Der normale Liquor ist wasserklar und farblos. Eine Trübung des Liquors spricht für eine stark erhöhte Zellzahl von mehr als 1000 Leukozyten/ μl und findet sich beispielsweise bei Vorliegen einer bakteriellen Meningitis. Kommt es zu einer rötlichen Verfärbung, spricht dies für eine frische Blutung mit Erythrozytenzahlen von mindestens 1000/ μl . Um eine artifizielle Blutbeimengung im Rahmen einer traumatischen Punktion zu erkennen, empfiehlt sich die Durchführung einer sogenannten Drei-Gläser-Probe. Zeigt sich in drei hintereinander befüllten Liquorröhrchen eine ungleichmäßige Rotfärbung, spricht dies gegen eine echte Subarachnoidalblutung. Zeigt sich hingegen eine

gelbliche Verfärbung des Liquors, spricht man von Xantochromie. Eine Xantochromie deutet auf einen erhöhten Gehalt an Blutabbauprodukten und somit auf eine abgelaufene, nicht mehr frische Blutung hin (29). Darüber hinaus erlaubt die visuelle Inspektion im Falle einer Ausbildung von Gerinnseln eine erste Aussage bezüglich des Eiweißgehaltes der Probe, welcher dann wahrscheinlich stark erhöht und größer als 3000 mg/l ist (30; 31).

Die normale Zellzahl von Liquor cerebrospinalis entspricht 0 – 4 Leukozyten/ μ l. Bei blutigen Liquorproben muss die Leukozytenzahl in Abhängigkeit von der Erythrozytenzahl nach unten korrigiert werden. Je 1000 Erythrozyten/ μ l wird 1 Leukozyt/ μ l abgezogen. Die Zellzahl liefert beispielsweise in der Notfalldiagnostik einen ersten wichtigen Hinweis darauf, ob eine akute bakterielle Meningitis vorliegen könnte. Die Zellzählung kann optisch in der Fuchs-Rosenthal-Kammer oder automatisch mittels Durchflusszytometrie an Blutzell-Zählgeräten erfolgen. Bei niedrigen Zellzahlen von 0-5 Leukozyten/ μ l scheint die optische Zählkammermethode der automatischen Zellzählung überlegen (32; 33). Der Gesamteiweißgehalt der Probe ist abhängig vom Entnahmeort, der Referenzbereich für Lumballiquor wird teils mit 200 – 500 mg/l angegeben (31). Andere Publikationen empfehlen einen höheren oberen Grenzwert um 600 mg/l (34). Die Bestimmung kann über verschiedene Nachweis-Methoden automatisiert erfolgen. Der Gesamteiweißgehalt ist im Rahmen unterschiedlicher Krankheitsbilder erhöht und muss im Kontext beurteilt werden (35). Der Lactatgehalt (L-Lactat) und der Liquor/Serum-Glucose-Quotient dienen insbesondere der Einordnung von entzündlichen Prozessen. Ein Lactat-Gehalt über 3,5 mmol/l und ein erniedrigter Liquor/Serum-Glucose-Quotient sind dabei hinweisend auf eine bakterielle Meningitis (36). Der Nachweis des Lactatgehalts und des Liquor/Serum-Glucose-Quotienten erfolgt mittels enzymatisch-optischer Methode. Der Referenzbereich für Lactat in lumbalem Liquor ist altersabhängig und umfasst 1,1 – 2,6 mmol/l (31). Zur Bestimmung des Liquor/Serum-Glucose-Quotienten (sowie der Liquor/Serum-Quotienten für Albumin und Immunglobuline, s. u.) ist die Einsendung von parallel zur Liquorpunktion abgenommenem Serum notwendig. Der Referenzbereich ist dabei abhängig von der Glucosekonzentration im Serum (37).

Zur standardmäßigen Proteindiagnostik zählen die Bestimmung der Liquor/Serum-Quotienten für Albumin und Immunglobuline (IgG, IgA, IgM) und der Nachweis

sogenannter oligoklonaler Banden. Mit Hilfe des Albumin-Quotienten ist es möglich, die Intaktheit der Blut-Hirn-Schranke abzuschätzen bzw. eine Schrankenstörung zu erkennen. Ein erhöhter IgG-Quotient spricht für eine intrathekale Synthese von Immunglobulinen im Rahmen eines entzündlichen Geschehens. Die ermittelten Quotienten werden zusammen in einem Reiber-Diagramm dargestellt und erlauben eine grobe Einordnung der zugrundeliegenden Pathologie in Erkrankungen mit isolierter Schrankenstörung, isolierter intrathekaler Immunglobulinsynthese oder mit einer Kombination aus Schrankenstörung und intrathekaler Immunglobulinsynthese bei akuten entzündlichen Prozessen (15). Der Nachweis einer intrathekalen Immunglobulinsynthese in Form von oligoklonalen IgG-Banden mittels isoelektrischer Fokussierung ist ein ausgesprochen sensibles Verfahren und insbesondere in der diagnostischen Abklärung chronisch-entzündlicher Erkrankungen, allen voran der Multiplen Sklerose, wegweisend (38).

Die mikroskopische Beurteilung zytologischer Präparate ist der Goldstandard zur exakten Differenzierung der Liquorzellen. Die Zelldifferenzierung am Durchflusszytometer ist sehr ungenau, differenziert lediglich mononukleäre und polymorphnukleäre Zellen und kann die mikroskopische Beurteilung daher in keinem Fall ersetzen (39). Die zytologischen Präparate werden im Rahmen der Akutdiagnostik im Anschluss an die Zellzählung möglichst frühzeitig angefertigt. Zur Auswahl stehen verschiedene Sedimentations- und Zytozentrifugations-Techniken. Sofern genügend Liquor zur Verfügung steht, empfiehlt sich die Anlage von mindestens 2 zytologischen Präparaten. Besteht der Verdacht auf eine Meningeosis neoplastica kann es sinnvoll sein, mehrere Präparate anzulegen und somit weiterführende immunzytochemische Färbungen zu ermöglichen. Die Färbung nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa) stellt die Standardfärbung in der Liquorzytologie dar. Weitere Färbungen, wie beispielsweise die Berliner-Blau-Färbung zum Nachweis von Hämosiderin oder die Gram-Färbung zum Nachweis von Bakterien, können bei Bedarf ergänzt werden. Nur die mikroskopische Beurteilung durch in der Liquorzytologie geschulte und erfahrene Befunder*innen ermöglicht eine exakte Differenzierung der Zellen und verlässliche Einordnung des Befundes. Die mikroskopische Beurteilung des gesamten Präparats erfolgt in einer Übersichtsvergrößerung sowie in der erhöhten Vergrößerung (40x, ggf. 100x) unter Berücksichtigung der klinischen Angaben. Liegen mehrere Präparate vor, müssen diese ebenfalls vollständig begutachtet werden. Das normale Zellbild des

Liquors besteht aus nicht aktivierten Lymphozyten und Monozyten im Verhältnis 90:10 bis 50:50 in Abhängigkeit von der Präparationstechnik. Abzugrenzen sind artifizielle Beimengungen von beispielsweise Ependymzellen, Knorpelzellen und Knochenmark (40; 18: 41).

Eine exakte zytologische Beurteilung setzt einen guten Erhaltungszustand der Zellen voraus. Dies stellt in der Liquordiagnostik eine besondere Herausforderung dar, weil es sich bei Liquor cerebrospinalis um äußerst sensibles Probenmaterial handelt. Dies wird insbesondere seiner im Vergleich zu Blut niedrigen Zellzahl und relativen Eiweißarmut zugeschrieben (42). Dass der Zusatz von Rinderserumalbumin vor Zentrifugation den Erhaltungszustand der Zellen deutlich verbessert, unterstreicht diese Annahme (43). Im Rahmen der Punktion kommt der Liquor zusätzlich mit dem Sauerstoff der Luft in Kontakt, was zu einem pH-Umschlag und katabolen Mechanismen mit bereits sehr frühem Untergang von Zellen führt (40). Bekannt ist, dass bereits 2 Stunden nach Entnahme ca. 40% der neutrophilen Granulozyten und, in geringerem Ausmaß, auch andere Leukozyten autolytisch sind (44) und dass auch die Zellzahl 2 Stunden nach Abnahme nicht mehr sicher beurteilbar ist (31).

Zahlreiche präanalytische Einflussfaktoren auf die Qualität des Untersuchungsergebnisses von Laboranalysen wurden identifiziert. Anfällig für Fehler sind dabei insbesondere die Beauftragung der angemessenen Analyse, die Abnahme der Probe, die Verwendung eines geeigneten Probengefäßes, die korrekte Kennzeichnung des Probengefäßes, die richtige Zuordnung von Probe und Patient*in, der Transport in das Labor sowie die manuelle Handhabung der Probe im Labor. Zu beachten ist, dass die Mehrheit der relevanten Fehler in der Präanalytik, d. h. vor bzw. in Vorbereitung auf die eigentliche Analyse, auftritt (45; 46). Für die Liquordiagnostik gelten einzelne dieser genannten Einflussfaktoren als besonders bedeutsam. Zuallererst wird meist die Zeit, die zwischen Probengewinnung und Zellzählung sowie bis zur Anfertigung der zytologischen Präparate vergeht, genannt. Hierbei dürfen nicht mehr als 2 Stunden vergehen, da ansonsten mit einem verfälschten Zellbild und einer verminderten Beurteilbarkeit der Zellelemente aufgrund autolytischer Veränderungen zu rechnen ist (40). Empfohlen wird eine Bearbeitung innerhalb der ersten Stunde nach Punktion (7). Als ideale Lagerungstemperatur wird der Bereich zwischen 5°C und 12°C angegeben, da bei niedrigeren Temperaturen eine Kältelyse auftreten kann, bei

höheren Temperaturen dagegen katabole Mechanismen beschleunigt werden. Akzeptiert wird ein Versand des Liquors bei Raumtemperatur innerhalb von 2 Stunden per Kurier bzw. Bote (40). Erschütterungen der Probe während des Transports sollen so gering wie möglich gehalten werden, weshalb ein Probenversand per Rohrpost nicht empfohlen wird (41). Auch die Wahl des Probengefäßes kann das Untersuchungsergebnis beeinflussen, da beispielsweise im Rahmen einer Demenzdiagnostik zu analysierende Proteine an bestimmten Oberflächen haften (47), weshalb die Verwendung von nicht-haftenden Polypropylen-Röhrchen empfohlen wird. Ein nicht zu unterschätzendes Problem in der Liquordiagnostik stellt die Verfügbarkeit von ausreichend Probenmaterial dar. Da eine Lumbalpunktion relativ aufwendig und für Patient*innen oft unangenehm ist, kann diese nicht einfach wiederholt werden. Wurde bei der Punktion nicht genügend Material gewonnen, können Analysen gegebenenfalls nicht durchgeführt werden. Darüber hinaus können die Ergebnisse von Zellzählung, Zelldifferenzierung und Proteindiagnostik durch eine Blutbeimengung oder bestimmte therapeutische Maßnahmen, beispielsweise eine intrathekale Zytostatikaapplikation, eine Plasmapherese oder eine Therapie mit Immunglobulinen, verfälscht werden (31).

Bekannt ist darüber hinaus, dass unterschiedliche Methoden zur Anfertigung der zytologischen Präparate mit einer unterschiedlichen Zellausbeute und Zellmorphologie einhergehen. Die Zellausbeute ist unter Einsatz von Zentrifugationsverfahren deutlich gesteigert, was insbesondere bei zellarmen Liquores von Vorteil ist. In Abhängigkeit von der Beschleunigung kommt es jedoch auch zu Zellartefakten in Form einer Ausbreitung von Zellen, zu Rupturen von Kern- und Zellmembranen, zu hervortretenden Nukleoli, zu einer Vakuolisierung des Zytoplasmas sowie zu deformierten Monozyten. Wirken hohe Zentrifugalkräfte auf die Zellen ein, kann es auch zu Verdichtungen und Verklumpungen des Chromatins kommen (Abbildung 6, rechts). Es wird ebenfalls postuliert, dass im Rahmen der Zentrifugation bereits vorgeschädigte Zellen weiter degradieren (48; 43). Die Zelldarstellung mittels Sedimentationsverfahren geht hingegen mit einer deutlich reduzierten Zellausbeute einher, wird aber als realistischer angegeben, d. h. sie ist vergleichbarer mit der Zelldarstellung in Blutaussstrichen (49).

Um insbesondere den Einfluss der genannten präanalytischen Faktoren auf die am Institut für Neuropathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin begutachteten zytologischen Präparate des Liquors besser einschätzen und ggf. Maßnahmen zur

Verbesserung entwickeln zu können, wurde die vorliegende Arbeit konzipiert. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss hat eine verzögerte Anfertigung der Zytospinpräparate auf den Anteil an intakten Zellen?
2. Welchen Einfluss hat die Umgebungstemperatur, dokumentiert in Form der Tageshöchsttemperatur, auf den Anteil intakter Zellelemente?
3. Führt ein erschütterungsarmer Transport in einer Styroporbox zu einer Steigerung des Anteils an intakten Zellelementen?
4. Korreliert der Eiweiß-Gehalt der Probe mit dem Anteil an intakten Zellen? Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Glucose- und dem Lactat-Gehalt der Probe und dem Erhaltungszustand der Zellen?
5. Ist ein Einfluss der manuellen Handhabung auf den Anteil intakter Zellelemente nachweisbar, wenn Proben aliquotiert und parallel in 2 Laboren prozessiert werden?
6. Wie groß ist die Variabilität im Erhaltungszustand der Zellen innerhalb einer Liquorprobe, wenn jeweils 2 Zytospinpräparate einer Probe verglichen werden?
7. Wie groß ist die Variabilität in der mikroskopischen Beurteilung des Erhaltungszustandes der Zellen durch 2 Befunder*innen?

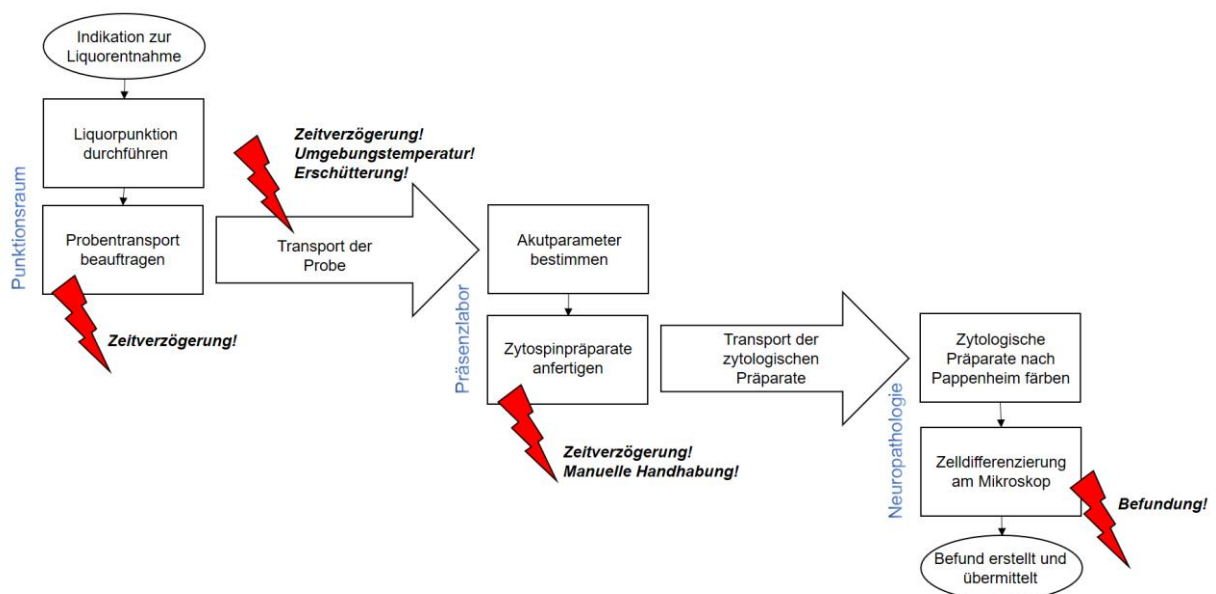


Abbildung 1: Ablauf der Liquorzytologie mit möglichen Fehlerquellen

III. Material und Methoden

III.1 Material

Zu Beginn der Studie wurde ein Ethikvotum des Ethikausschusses 1 am Campus Charité-Mitte der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin eingeholt. Die Ethikkommission stimmte dem Vorhaben zu (EA1/365/14; Vorsitzender: Prof. Dr. med. Uebelhack). Eine Einwilligungserklärung der Patient*innen war nicht erforderlich, da ausschließlich im Rahmen der Diagnostik angefertigte Zytospinpräparate sowie übriggebliebene und für diagnostische Untersuchungen nicht mehr benötigte Liquor-Reste in vollständig anonymisierter Form verwendet wurden.

Im Zeitraum von September 2014 bis Mai 2016 wurden Liquorproben in Form von Zytospinpräparaten von 130 Patient*innen untersucht. Nicht eingeschlossen wurden Liquorproben von Patient*innen unter intrathekaler zytostatischer Therapie. Nachträglich ausgeschlossen wurden 8 Liquorproben, welche in Laboren mit abweichendem Protokoll zur Herstellung von Zytospinpräparaten bearbeitet wurden, sowie 3 Liquorproben, welche nicht innerhalb der ersten beiden Stunden nach Abnahme im Labor eintrafen (Abbildung 2).

Zu allen analysierten Liquorproben wurden die Zeit zwischen Abnahme und Ankunft im Labor, der Standort des Labors, welches die Zytospinpräparate angefertigt hat, die Zellzahl (gemessen mithilfe des Sysmex 5000 im BodyFluid-Modus), die Art des Transports sowie die maximale Tagestemperatur erfasst und im Erhebungsbogen (siehe Anhang) dokumentiert. Der Median (25./75. Perzentile) der Zellzahl betrug 3 (1 / 11,25), die Zellzahl erstreckte sich von 0/µl bis 1041/µl. Von 83 Liquorproben wurde zusätzlich der im Rahmen der Routine-Diagnostik mithilfe des Sysmex 5000 im BodyFluid-Modus gemessene Gehalt an Eiweiß (Median = 388,4 mg/l), Glucose (Median = 63 mg/dl) und Lactat (Median = 14,7 mg/dl bzw. 1,6 mmol/l) erfasst.

Von 36 Proben war genügend Rest-Volumen vorhanden, sodass zu den routinemäßig innerhalb der ersten Stunde angefertigten Zytospinpräparaten zusätzliche experimentelle Präparate innerhalb der zweiten und der dritten Stunde angefertigt werden konnten, um eine mögliche Degradierung der Zellen im Zeitverlauf zu

dokumentieren. Die Liquorproben wurden während dieser Zeit in einer Styroporbox stehend sowie lichtgeschützt und wärmeisoliert gelagert.

Von 35 Patient*innen wurden die Liquorproben unmittelbar nach der Abnahme persönlich auf Station abgeholt und stehend, lichtgeschützt und wärmeisoliert in einer Styroporbox in das Liquorlabor transportiert. Hier wurden Zytospinpräparate innerhalb der ersten Stunde nach Abnahme angefertigt. Diese wurden mit Zytospinpräparaten von 35 Proben verglichen, welche innerhalb der ersten Stunde nach Abnahme auf herkömmlichem Wege mittels Kurier bzw. Bote in einer durchsichtigen Plastiktüte das Labor erreicht hatten. Ausgeschlossen wurden dabei Proben, welche an besonders heißen Tagen mit einer Tageshöchsttemperatur > 30°C gewonnen wurden.

Von 16 Liquorproben wurden zeitgleich Zytospinpräparate in 2 verschiedenen Laboren nach demselben Protokoll (s. u.) angefertigt und hinsichtlich des Erhaltungszustands der Zellen verglichen.

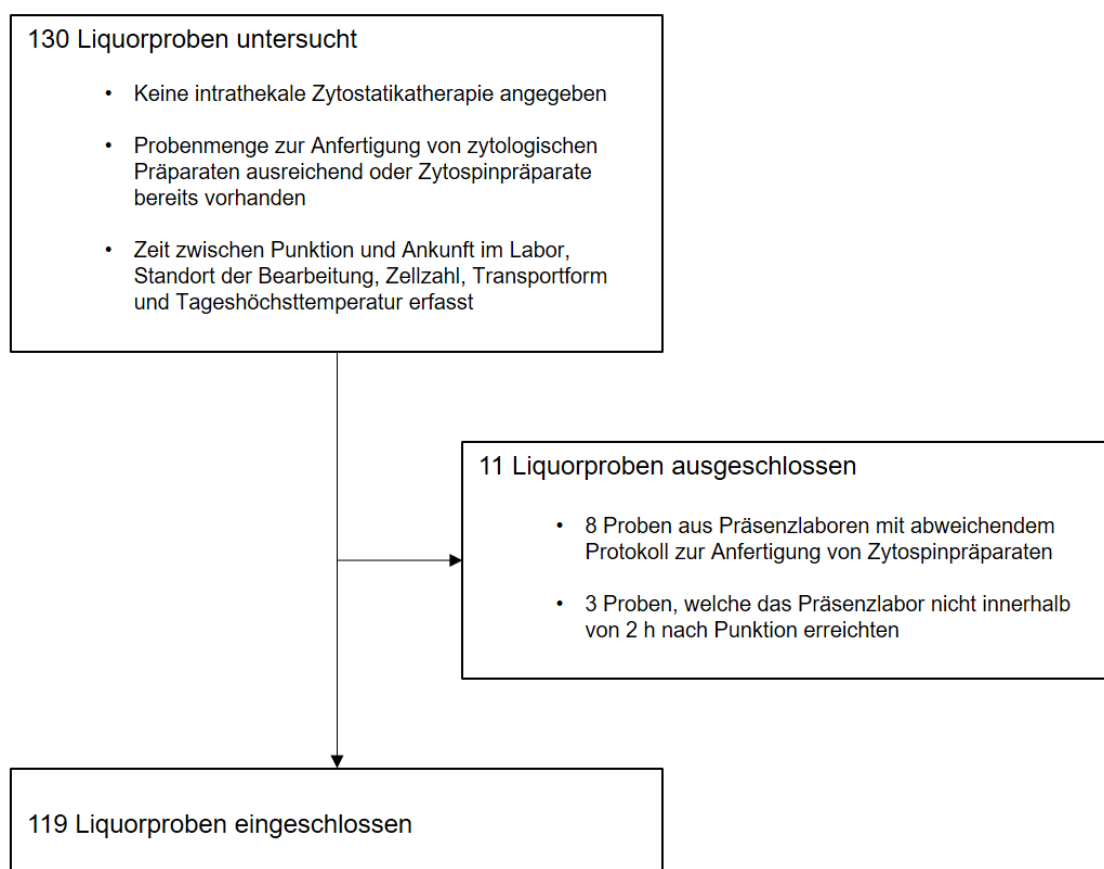


Abbildung 2: Probeneinschluss

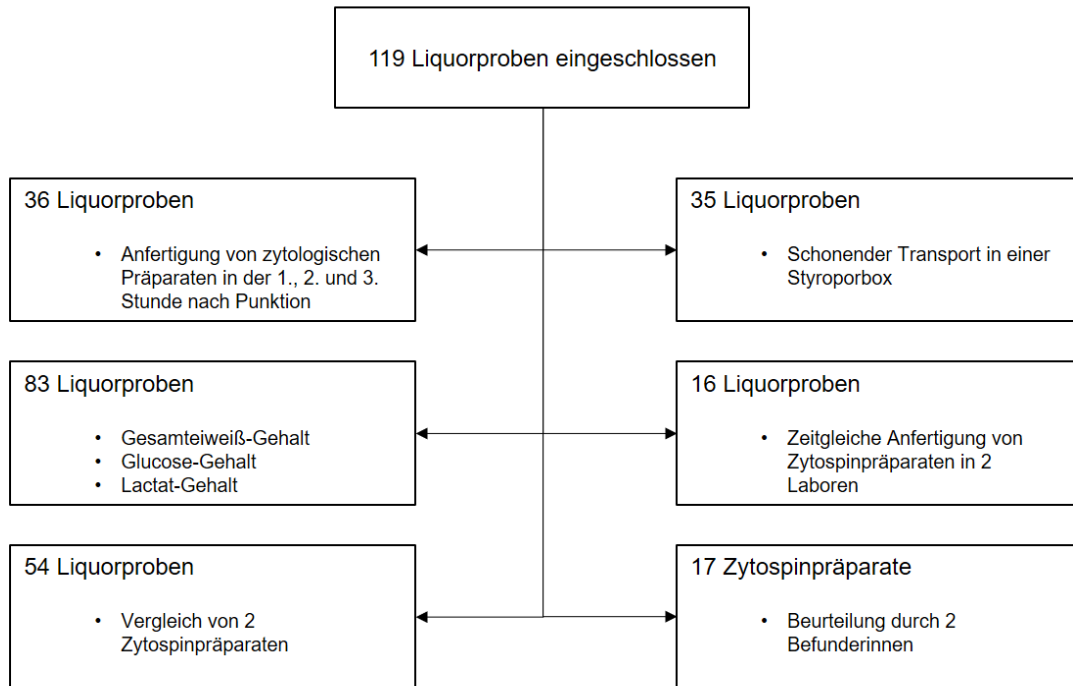


Abbildung 3: Über das Standardprogramm hinausgehende Prozessierung und Beurteilung

III.2 Zytologische Beurteilung

Die Zytospinpräparate wurden in allen Laboren nach folgendem Protokoll angefertigt: 100 µl einer 1%igen Albuminlösung (RSA) und 500 µl Liquor (bei einer Zellzahl bis 150 Zellen/µl) bzw. 250 µl Liquor (bei einer Zellzahl > 150 Zellen/µl) wurden in den Einfüllstutzen des vorbereiteten Gespanns mit Objektträger und Filterpapier gegeben und 3 Minuten bei 1500 rpm in der Hettich-Zytozentrifuge zentrifugiert. Der Liquorüberstand wurde im Anschluss vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und verworfen. Das Präparat wurde ca. 10 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa) gefärbt.

Die Pappenheimfärbung wurde wie folgt angefertigt:

Die Präparate wurden für 5 Minuten in May-Grünwald-Lösung getaucht, im Anschluss in Leitungswasser gespült und danach für 20 Minuten in Giemsa-Gebrauchslösung getaucht. Die Giemsa-Gebrauchslösung wurde immer frisch angesetzt (20 ml Giemsa-Stammlösung + 180 ml Aqua dest.).

Die mikroskopische Auswertung aller Zytospinpräparate erfolgte durch die in der Liquorzytologie erfahrene und durch einen vor-Ort-Ringversuch zur praktischen Liquorzytodiagnostik (INSTAND e. V. in Zusammenarbeit mit der deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und klinische Neurochemie e. V.) bestätigte Promovendin. 17 Zytospinpräparate wurden zusätzlich von einer zweiten, in der Liquorzytologie erfahrenen und ebenfalls durch vor-Ort-Ringversuche zur praktischen Liquorzytodiagnostik bestätigten Befunderin analysiert. Die Ergebnisse beider Befunderinnen wurden im Anschluss miteinander verglichen.

Von 54 Liquorproben wurden die Ergebnisse der Zelldifferenzierung von 2 gleichzeitig angefertigten Zytospinpräparaten verglichen, um die Variabilität im Erhaltungszustand der Zellen zum selben Zeitpunkt abzubilden.

Sämtliche zur Verfügung stehende Zytospinpräparate (bis zu vier Präparate je Zeitpunkt) wurden mikroskopisch beurteilt. In der 40x-Vergrößerung wurden alle zur Darstellung kommenden Zellelemente als intakte Zelle, Zelle mit autolytischen Veränderungen, Zelle mit artifiziellen Veränderungen oder Zellschatten klassifiziert

(Abbildung 4, 5, 6). Die absolute Anzahl an intakten, autolytischen und artifiziellen Zellen sowie an Zellschatten wurde gezählt und mithilfe des Erhebungsbogens dokumentiert. Abschließend wurden die absoluten Zahlen in Prozentangaben (Anteil intakter, autolytischer, artifizieller Zellen und Zellschatten an der Gesamtheit der Zellelemente) umgewandelt.

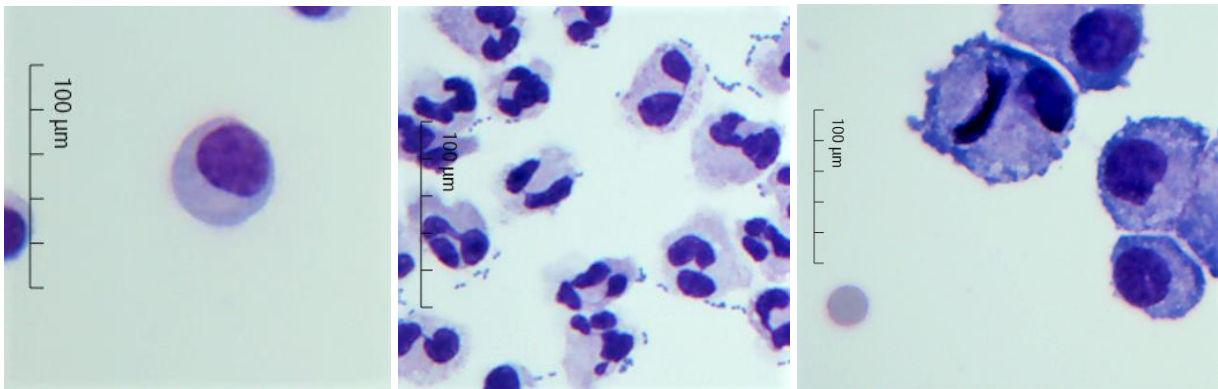


Abbildung 4: intakte Zellelemente (von links nach rechts: aktivierter Lymphozyt, neutrophile Granulozyten, epitheliale Tumorzellen)

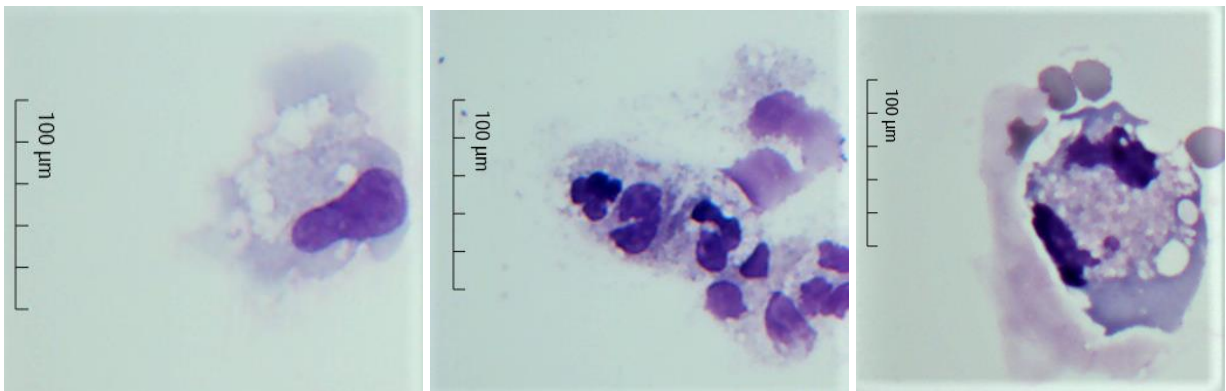


Abbildung 5: autolytische Zellelemente (von links nach rechts: am ehesten Monozyt; neutrophile Granulozyten; epitheliale Tumorzelle)

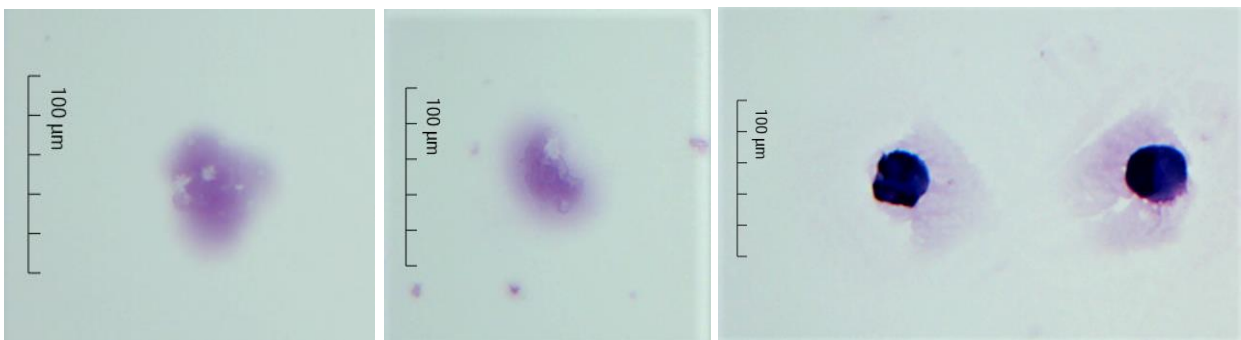


Abbildung 6: Zellschatten (links; Mitte) und artifizielle Zellelemente (rechts)

III.3 Datenerhebung und statistische Auswertung

Die auf dem Erhebungsbogen festgehaltenen Daten und Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung wurden in eine Microsoft® Office Excel®-Tabelle übertragen. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte mithilfe des Statistikprogramms IBM SPSS®-Version 27.

Nach Überprüfung auf Normalverteilung mittels Histogrammen sowie Kolmogorov-Smirnova- und Shapiro-Wilk-Test wurden kontinuierliche Daten als Median mit Perzentilen sowie als Minimum und Maximum dargestellt. Die statistischen Tests erfolgten mittels non-parametrischer Tests zum Vergleich 2 unabhängiger Variablen (Mann-Whitney-U-Test), zum Vergleich 2 abhängiger Variablen (Wilcoxon-Vorzeichenrangtest) sowie zum Vergleich 3 abhängiger Variablen (Friedman-Test). Darüber hinaus wurden Spearman-Rho-Korrelationen berechnet.

Ein $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen (sofern nicht anders angegeben).

IV. Ergebnisse

IV.1 Einfluss der Zeit

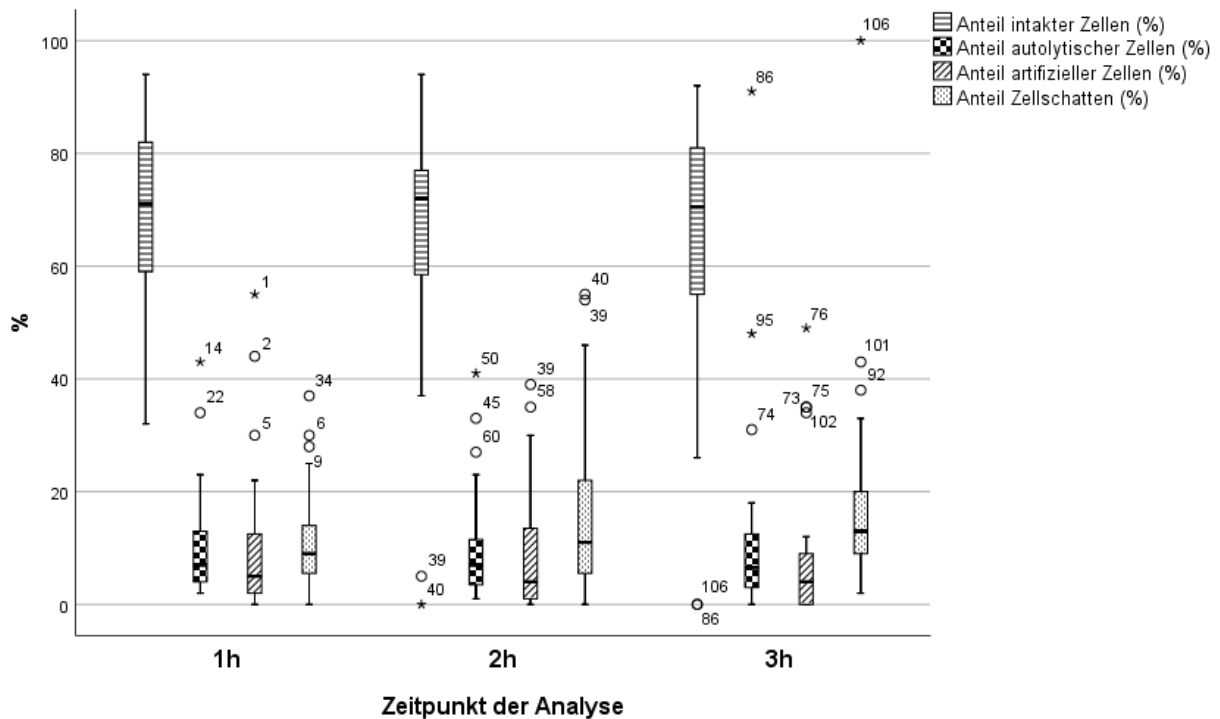


Abbildung 7: Erhaltungszustand von 36 Liquorproben in der 1., 2. und 3. Stunde nach Abnahme

Zeitpunkt der Analyse		Anteil intakter Zellen (%)	Anteil autolytischer Zellen (%)	Anteil artifizierter Zellen (%)	Anteil Zellschatten (%)
1 h	Median	71	7	5	9
	(25./75. P.)	(58,5 / 82)	(4 / 13)	(2 / 12,75)	(5,25 / 14,5)
	Minimum	32	2	0	0
	Maximum	94	43	55	37
2 h	Median	72	7	4	11
	(25./75. P.)	(58,25 / 77)	(3,25 / 12,25)	(1 / 13,75)	(5,25 / 22,5)
	Minimum	0	1	0	0
	Maximum	94	41	39	55
3 h	Median	70,5	6,5	4	13
	(25./75. P.)	(54 / 81)	(3 / 12,75)	(0 / 9)	(9 / 20,5)
	Minimum	0	0	0	2
	Maximum	92	91	49	100
Asympt. Signifikanz		0,586	0,557	0,318	0,337

Tabelle 1: Erhaltungszustand von 36 Liquorproben in der 1., 2. und 3. Stunde nach Abnahme

Von 36 Liquorproben wurden innerhalb der 1., 2. und 3. Stunde nach Abnahme jeweils 1 bis 2 Zytospinpräparate angefertigt und hinsichtlich des Anteils intakter, autolytischer und artifizieller Zellelemente sowie hinsichtlich des Anteils an Zellschatten mikroskopisch beurteilt. Mithilfe des Friedman-Tests für abhängige Variablen ergibt sich keine Evidenz für einen signifikanten Effekt der Zeit auf den Erhaltungszustand der Zellen im Verlauf von 3 Stunden. Der Median des Anteils intakter, autolytischer und artifizieller Zellelemente bleibt nahezu gleich. Der Median des Anteils an Zellschatten steigt leicht an von 9 % innerhalb der ersten Stunde auf 13 % innerhalb der dritten Stunde nach Abnahme. Dennoch sind Unterschiede auszumachen, welche für eine möglichst zeitnahe Anfertigung der Zytospinpräparate sprechen können. Wurden die Präparate innerhalb der ersten Stunde angefertigt, waren in allen 36 Proben mindestens 32 % der gezählten Zellen intakt, maximal 43 % zeigten autolytische Veränderungen und maximal 37 % waren zu Zellschatten degradiert. Wurden die Präparate innerhalb der dritten Stunde nach Abnahme angefertigt, zeigten 2 Proben keine intakten Zellelemente mehr und wiesen über 90 % autolytische Zellelemente bzw. Zellschatten auf.

IV.2 Einfluss der Umgebungstemperatur

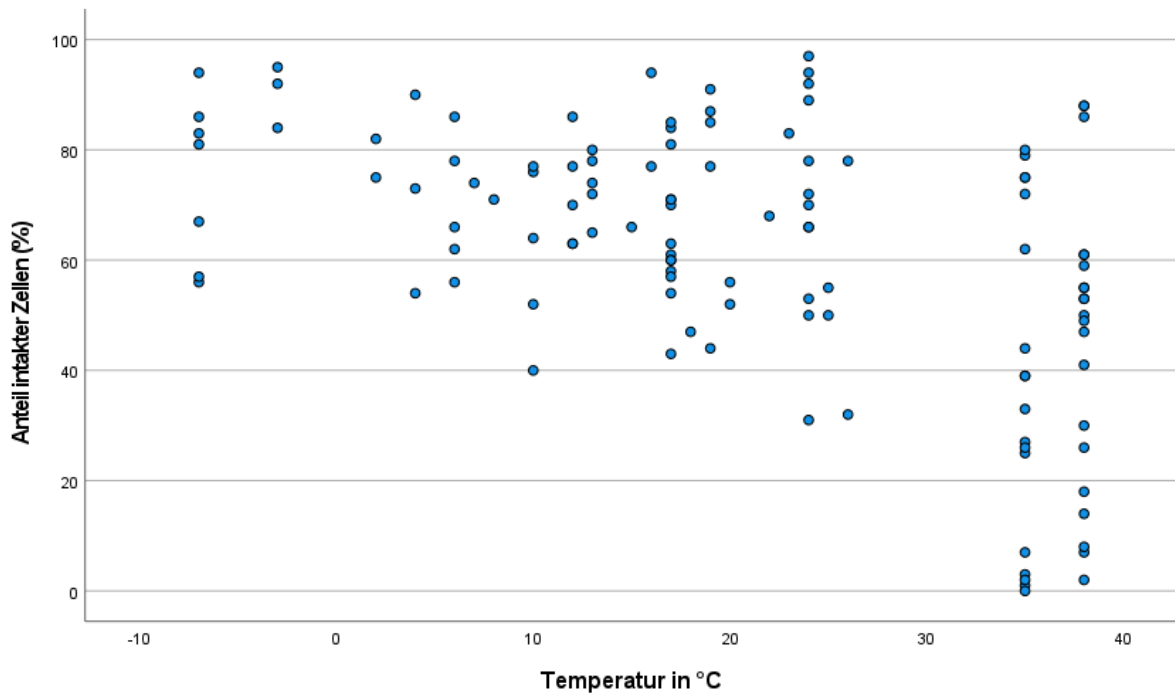


Abbildung 8: Darstellung des Anteils an intakten Zellen von 119 Liquorproben in Abhängigkeit von der Tageshöchsttemperatur

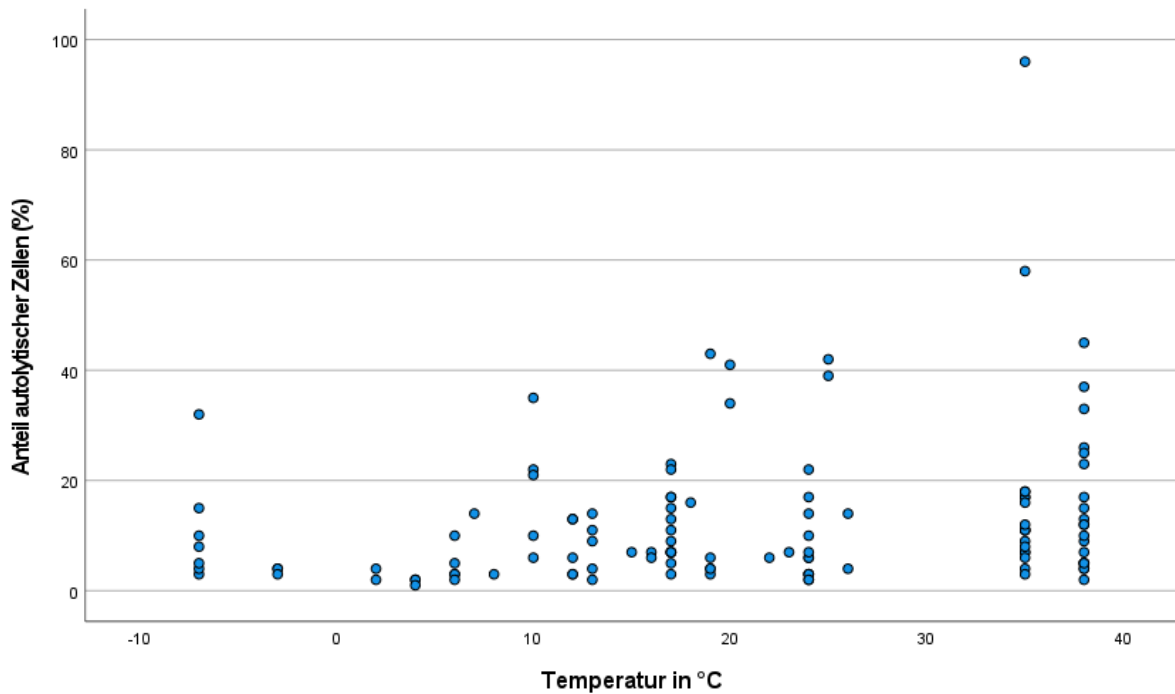


Abbildung 9: Darstellung des Anteils an autolytischen Zellen von 119 Liquorproben in Abhängigkeit von der Tageshöchsttemperatur

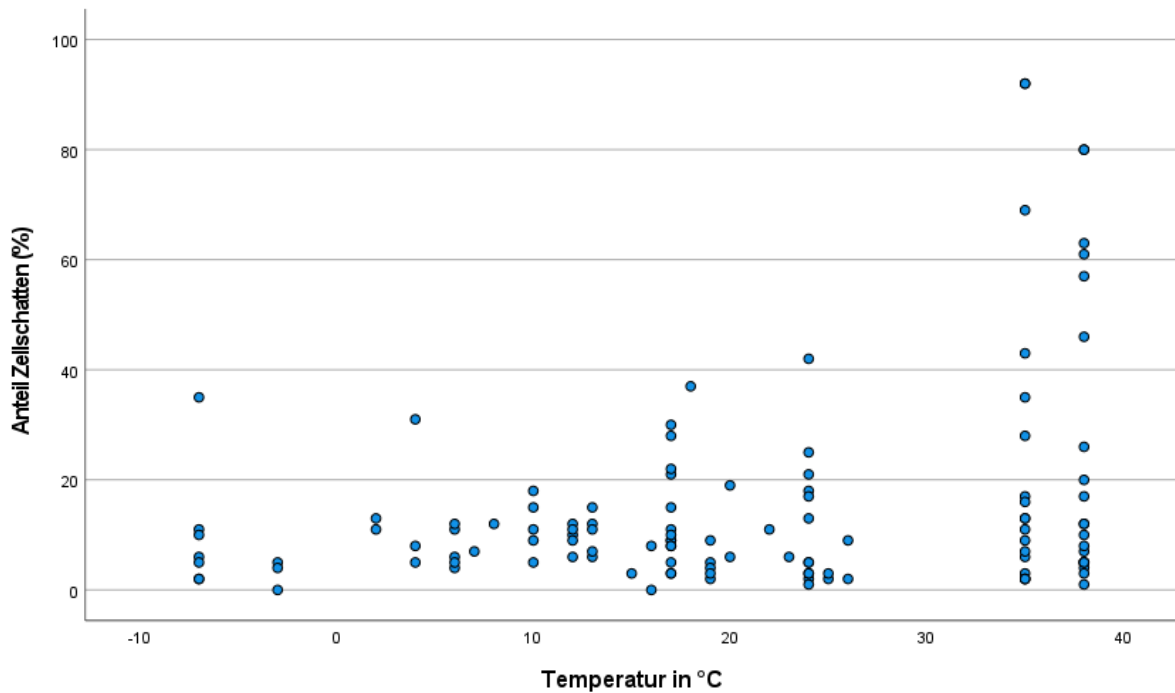


Abbildung 10: Darstellung des Anteils an Zellschatten von 119 Liquorproben in Abhängigkeit von der Tageshöchsttemperatur

	Temperatur in °C	Anteil intakter Zellen (%)	Anteil autolytischer Zellen (%)	Anteil artifizierlicher Zellen (%)	Anteil Zellschatten (%)
Median	19	65	8	6	9
(25./75. Perzentile)	(12 / 35)	(50 / 78)	(4 / 16)	(2 / 17)	(5 / 17)
Minimum	-7	0	1	0	0
Maximum	38	97	96	62	92
Korrelationskoeffizient					
Temperatur in °C		-0,471**	0,292**	0,087	0,163
Sig. (2-seitig)		0,000	0,001	0,348	0,077

Tabelle 2: Von 119 Liquorproben wurde der Erhaltungszustand der Zellen mit der maximalen Außentemperatur am Tag der Abnahme korreliert (** die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig)).

Die maximale Außentemperatur am Tag der Abnahme wurde zu allen Liquorproben erfasst. Hierbei ließ sich mit Hilfe des Spearman-Rho-Tests (Tabelle 2) eine statistisch signifikante inverse Korrelation zu dem Anteil intakter Zellen sowie eine statistisch signifikante positive Korrelation zu dem Anteil autolytischer Zellen nachweisen. Zu dem Anteil artifizierlicher Zellen und Zellschatten ist hingegen keine statistisch signifikante Korrelation nachweisbar. Die grafische Darstellung deutet jedoch auf eine positive Korrelation der Tageshöchsttemperatur mit dem Anteil an Zellschatten bei höheren Außentemperaturen hin (Abbildung 10).

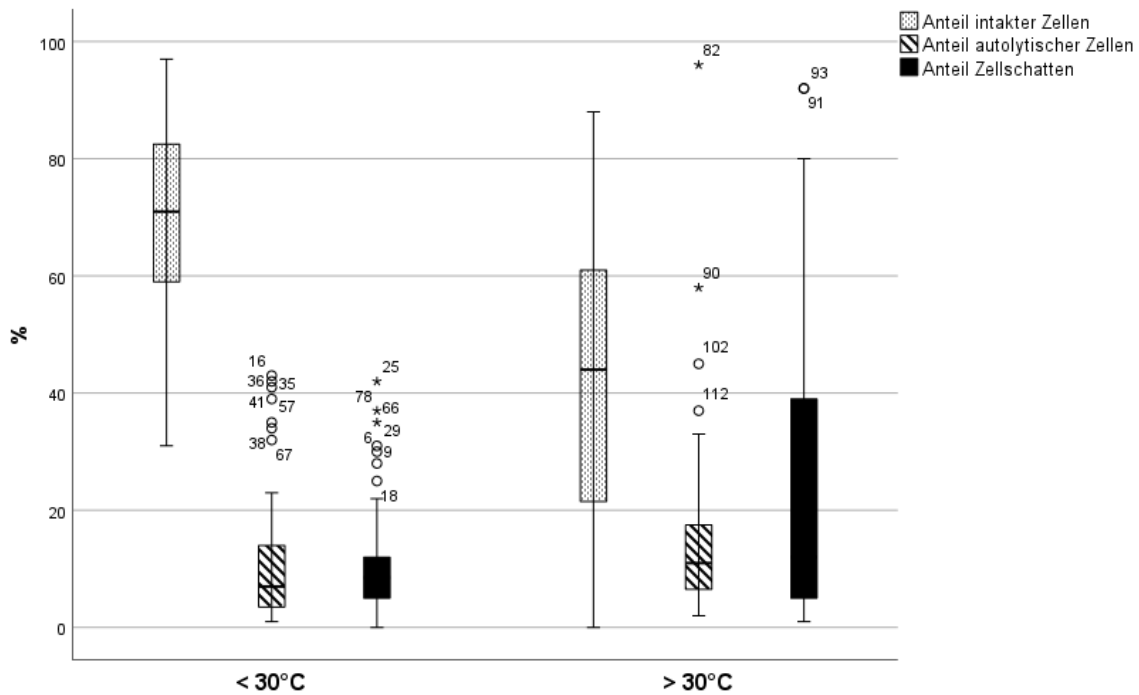


Abbildung 11: Darstellung des Anteils an intakten und autolytischen Zellen sowie Zellschatten von 119 Liquorproben in 2 Gruppen (Tageshöchsttemperatur < 30°C; Tageshöchsttemperatur > 30°C)

	intakte Zellen (%) < 30°C	intakte Zellen (%) > 30°C	Zellschatten (%) < 30°C	Zellschatten (%) > 30°C
N	80	39	80	39
Median	71	44	8,5	12
(25./75. Perzentile)	(58,5 / 82,75)	(18 / 61)	(5 / 12)	(5 / 43)
Minimum	31	0	0	1
Maximum	97	88	42	92
Asympt. Signifikanz (2-seitig)	0,000		0,018	
	autolytische Zellen (%) < 30°C	autolytische Zellen (%) > 30°C	artifizielle Zellen (%) < 30°C	artifizielle Zellen (%) > 30°C
N	80	39	80	39
Median	7	11	6	6
(25./75. Perzentile)	(3,25 / 14)	(6 / 18)	(1 / 13,75)	(2 / 27)
Minimum	1	2	0	0
Maximum	43	96	55	62
Asympt. Signifikanz (2-seitig)	0,009		0,249	

Tabelle 3: 119 Liquorproben wurden in 2 Gruppen (Tageshöchsttemperatur < 30°C; Tageshöchsttemperatur > 30°C) hinsichtlich des Erhaltungszustandes der Zellen miteinander verglichen.

Bildet man 2 Gruppen aus Proben, welche bei Temperaturen unter 30°C abgenommen und mittels Zytospinpräparaten untersucht wurden, und Proben, welche bei über 30°C maximaler Außentemperatur abgenommen und untersucht wurden (Tabelle 3), so findet sich mittels Man-Whitney-U-Test ein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf den Anteil intakter und autolytischer Zellen sowie den Anteil an Zellschatten. Bei hohen Außentemperaturen mit Tageshöchstwerten über 30°C ist der Anteil an intakten Zellen deutlich niedriger, während der Anteil an Zellschatten und autolytischen Zellelementen höher ist. Auf den Anteil an Zellen mit artifiziellen Veränderungen kann hingegen kein Einfluss der Außentemperatur festgestellt werden.

IV.3 Einfluss des Transportbehältnisses

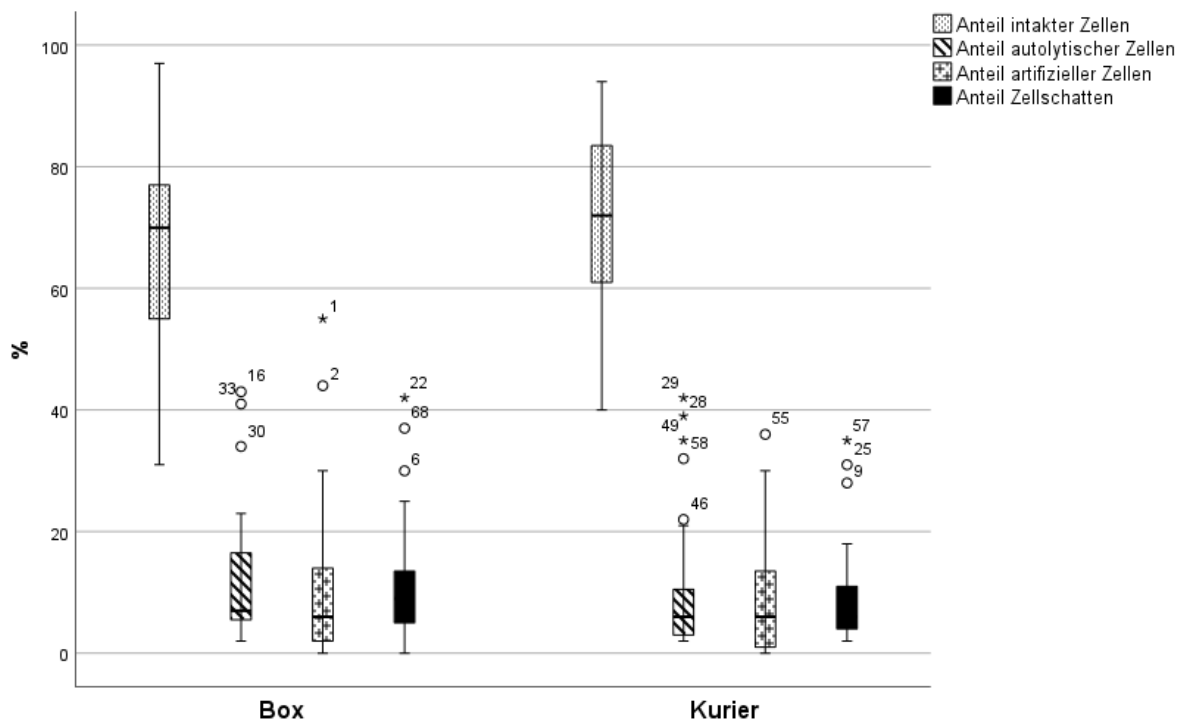


Abbildung 12: Darstellung des Erhaltungszustandes von 35 schonend transportierten Liquorproben (Box) und 35 konventionell transportierten Liquorproben (Kurier)

Transport		Anteil intakter Zellen (%)	Anteil autolytischer Zellen (%)	Anteil artifizierter Zellen (%)	Anteil Zellschatten (%)
1 (Box)	Median	70	7	6	9
	(25./75. Perzentile)	(54 / 77)	(5 / 17)	(2 / 16)	(5 / 15)
	Minimum	31	2	0	0
	Maximum	97	43	55	42
2 (Kurier)	Median	72	6	6	6
	(25./75. Perzentile)	(60 / 84)	(3 / 11)	(1 / 14)	(4 / 11)
	Minimum	40	2	0	2
	Maximum	94	42	36	35
Asympt. Signifikanz (2-seitig)		0,202	0,13	0,551	0,444

Tabelle 4: 35 schonend (in einer Styroporbox) transportierte Liquorproben wurden mit 35 konventionell (Kurier) transportierten Proben hinsichtlich des Erhaltungszustandes der Zellen verglichen.

35 Liquorproben wurden unmittelbar nach Entnahme im Punktionsraum abgeholt und stehend sowie wärmeisoliert und lichtgeschützt in einer Styroporbox in das Liquorlabor transportiert. Diese wurden mit 35 Liquorproben verglichen, welche auf dem üblichen

Wege mittels Kurierdienst, liegend in einer durchsichtigen Plastiktüte, das Labor erreicht hatten. Sämtliche Zytospinpräparate wurden innerhalb der ersten Stunde nach Abnahme angefertigt. Mithilfe des Mann-Whitney U-Tests ergeben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Erhaltungszustandes der Zytospinpräparate in Abhängigkeit vom Transportbehältnis.

IV.4 Einfluss des Eiweiß-, Glucose- und Lactatgehalts

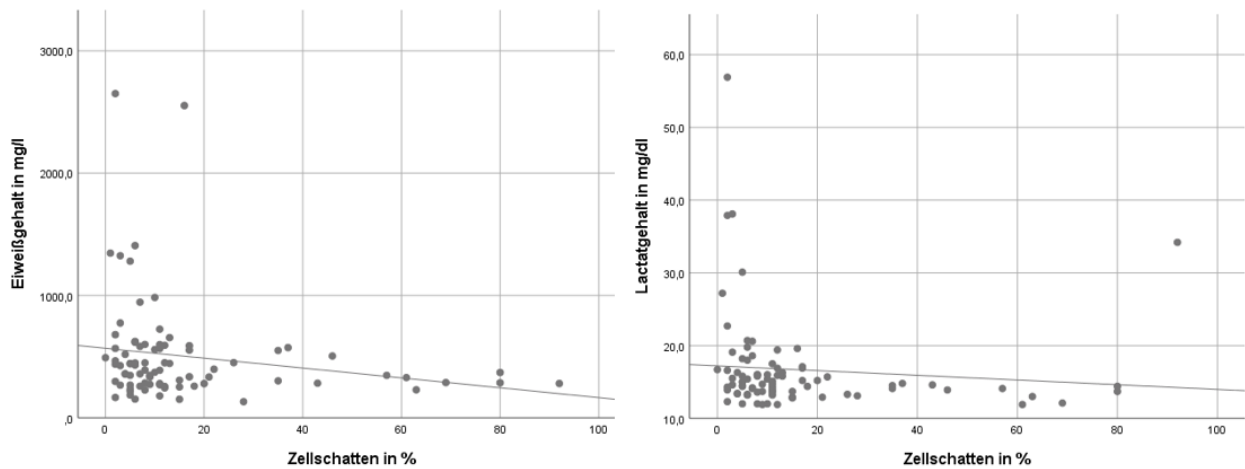


Abbildung 13: Darstellung des Anteils an Zellschatten von 83 Liquorproben in Abhängigkeit vom Eiweißgehalt (links) und vom Lactatgehalt (rechts)

		Anteil intakter Zellen (%)	Anteil Zellschatten (%)
Glucosegehalt in mg/dl	Korrelationskoeffizient	-0,089	0,191
	Sig. (2-seitig)	0,425	0,083
Lactatgehalt in mg/dl	Korrelationskoeffizient	0,052	-0,305**
	Sig. (2-seitig)	0,638	0,005
Eiweißgehalt in mg/l	Korrelationskoeffizient	-0,023	-0,219*
	Sig. (2-seitig)	0,835	0,047

Tabelle 5: Von 83 Liquorproben wurden der Anteil an intakten Zellen und Zellschatten mit dem Glucose-, Lactat- und Eiweißgehalt korreliert.

Von 83 Liquorproben wurden der Glucose-, Eiweiß- und Lactatgehalt erfasst. Mittels Spearman-Rho-Korrelationen zeigt sich kein Zusammenhang zwischen dem Glucosegehalt der Probe und dem Anteil intakter Zellen und Zellschatten im Zytospinpräparat. Der Eiweißgehalt und der Lactatgehalt der Probe scheinen ebenfalls keinen Einfluss auf den Anteil intakter Zellen zu haben. Es zeigt sich jedoch eine Evidenz für eine statistisch signifikante inverse Korrelation zwischen Lactat- und Eiweißgehalt und dem Anteil an Zellschatten. Die graphische Darstellung (Abbildung 13) und die berechneten Korrelationskoeffizienten (Tabelle 5) lassen jedoch keine starke Korrelation erkennen.

IV.5 Einfluss der manuellen Handhabung

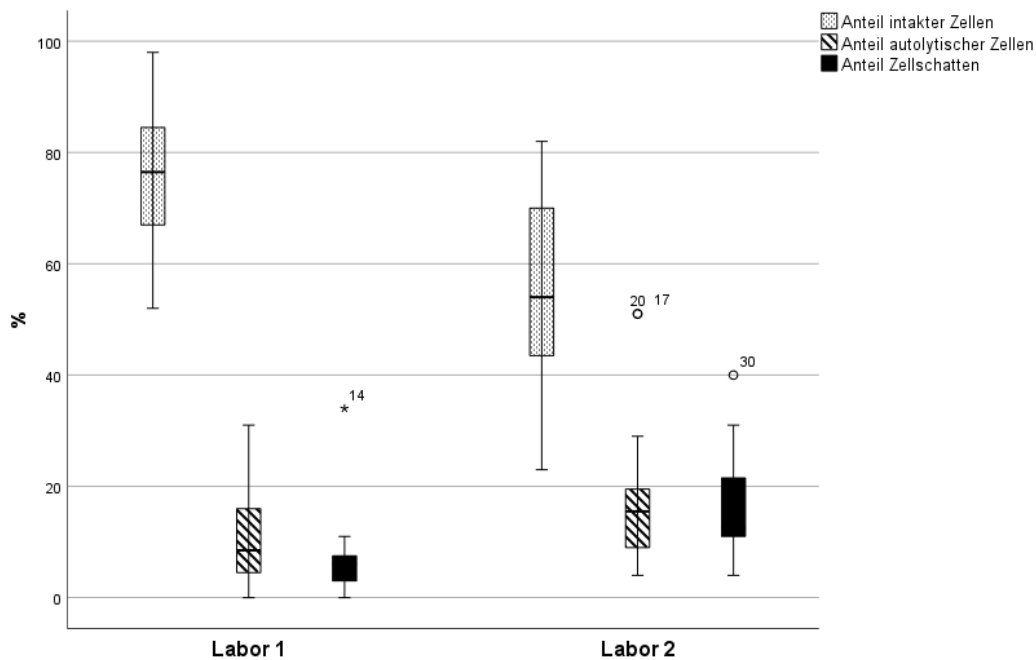


Abbildung 14: Darstellung des Anteils an intakten und autolytischen Zellen sowie an Zellschatten von 16 Liquorproben in Abhängigkeit von der manuellen Handhabung in Labor 1 (Labor 1) und Labor 2 (Labor 2)

	Anteil intakter Zellen (%)			Anteil Zellschatten (%)		
	Labor 1	Labor 2	delta	Labor 1	Labor 2	delta
Median	76,5	54	17,5	6	12,5	8
(25./75. Perzentile)	(66 / 84,75)	(42,25 / 70,5)	(9,5 / 28,75)	(3 / 8,25)	(11 / 23,75)	(6 / 14,75)
Minimum	52	23	2	0	4	0
Maximum	98	82	67	34	40	26
Asympt. Signifikanz	0,002			0,001		
	Anteil autolytischer Zellen (%)			Anteil artifizierter Zellen (%)		
	Labor 1	Labor 2	delta	Labor 1	Labor 2	delta
Median	8,5	15,5	8,5	4	10,5	6
(25./75. Perzentile)	(4,25 / 16,5)	(9 / 20,25)	(3,25 / 15,25)	(0,25 / 9,25)	(2 / 13,75)	(2,25 / 16,25)
Minimum	0	4	1	0	0	0
Maximum	31	51	34	33	36	33
Asympt. Signifikanz	0,049			0,306		

Tabelle 6: Von 16 Liquorproben wurden zeitgleich in 2 verschiedenen Laboren Zytospinpräparate angefertigt und diese hinsichtlich des Erhaltungszustandes der Zellen miteinander verglichen.

Mithilfe des Friedman-Tests für abhängige Variablen findet sich eine Evidenz für einen signifikanten Einfluss der manuellen Handhabung der Liquorproben auf den Erhaltungszustand der Zellen (Tabelle 6). Der Median des Anteils intakter Zellelemente ist für Zytospinpräparate, welche in Labor 1 angefertigt wurden, deutlich höher als für Zytospinpräparate, welche in Labor 2 angefertigt wurden (Abbildung 14), es ergibt sich eine mediane Abweichung von 17,5 %. Der Median des Anteils autolytischer Zellelemente sowie von Zellschatten hingegen ist für Zytospinpräparate aus Labor 1 deutlich niedriger als für Zytospinpräparate aus Labor 2 (mediane Abweichung von 8,5 % bzw. von 8 %). Für den Anteil an Zellelementen mit artifiziellen Veränderungen findet sich hingegen keine Evidenz für einen statistisch signifikanten Effekt der manuellen Handhabung durch das Laborpersonal.

IV.6 Variabilität in Abhängigkeit vom Präparat

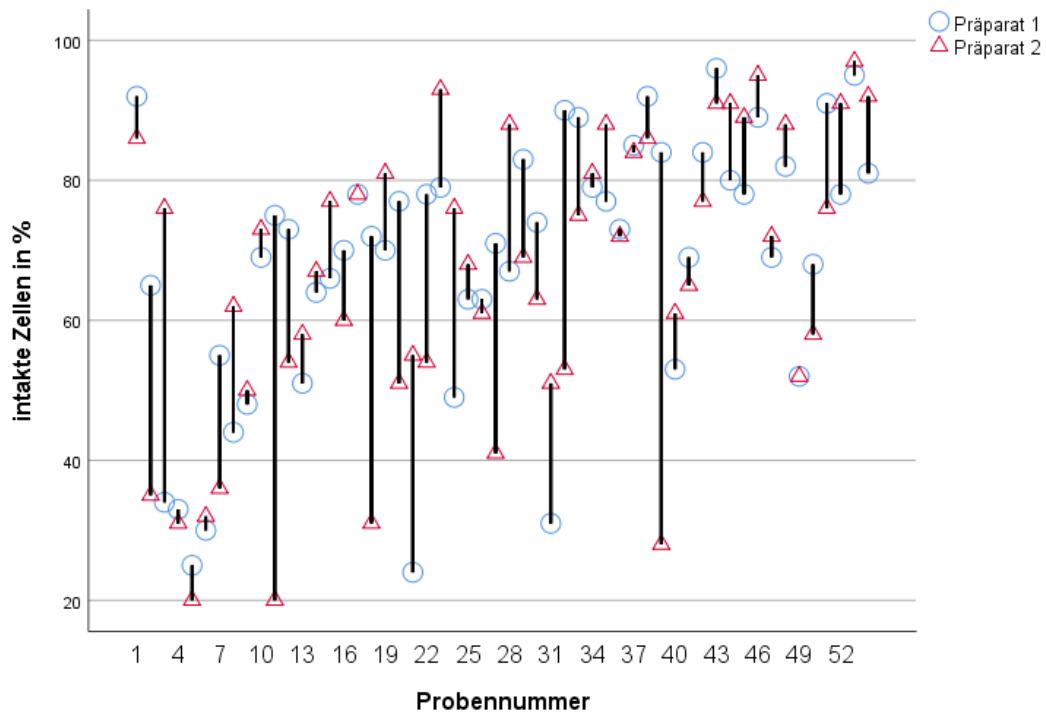


Abbildung 15: Von 54 Liquorproben wurde der Anteil an intakten Zellen von jeweils 2 zeitgleich angefertigten Zytospinpräparaten verglichen.

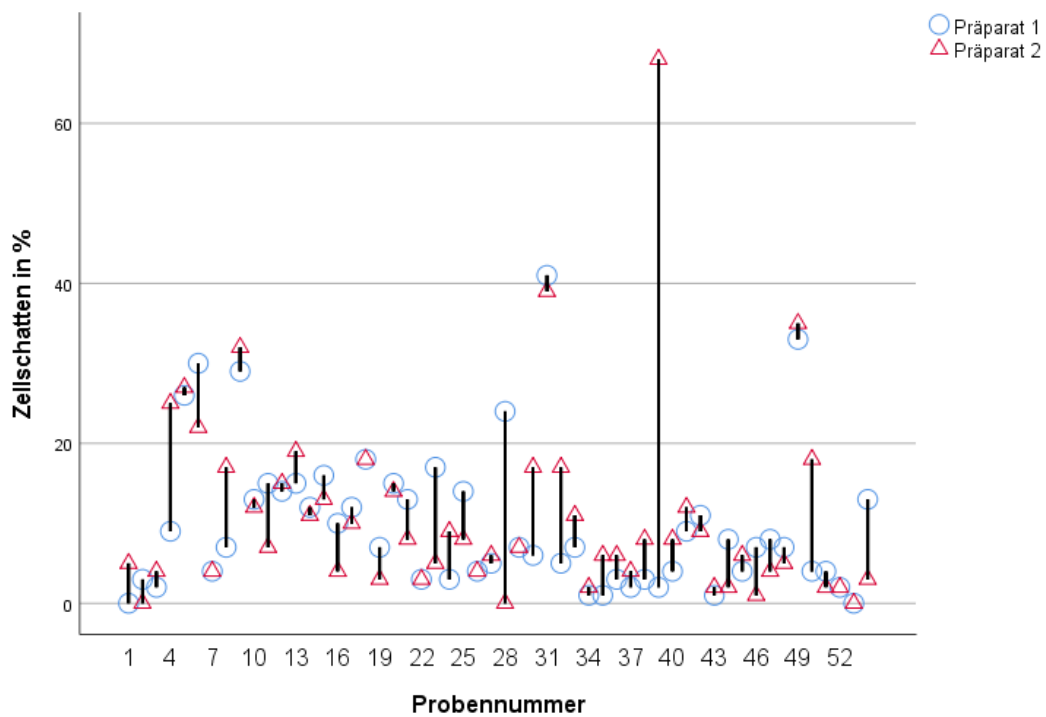


Abbildung 16: Von 54 Liquorproben wurde der Anteil an Zellschatten von jeweils 2 zeitgleich angefertigten Zytospinpräparaten verglichen.

	Anteil intakter Zellen (%)		Anteil Zellschatten (%)		Delta	
	Präparat 1	Präparat 2	Präparat 1	Präparat 2	Anteil intakter Zellen (%)	Anteil Zellschatten (%)
Median (25./75. Perzentile)	72,5 (61 / 81,25)	68,5 (52,75 / 84,5)	7 (3 / 14)	7,5 (4 / 15,5)	11 (4 / 19,25)	3 (1 / 6)
Minimum	24	20	0	0	0	0
Maximum	96	97	41	68	56	66
Korrelationskoeffizient	0,560**		0,507**			
Sig. (2-seitig)	0,000		0,000			

*Tabelle 7: Von 54 Liquorproben wurden zeitgleich 2 Zytospinpräparate angefertigt und hinsichtlich des Erhaltungszustandes der Zellen verglichen (** die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig)).*

Um die natürliche Spannweite des Erhaltungszustandes der Zellen innerhalb einer Liquorprobe abzubilden, wurden von 54 Proben jeweils 2 gleichzeitig angefertigte Zytospinpräparate hinsichtlich des Erhaltungszustandes der Zellen miteinander verglichen. Hierbei ergab sich eine mediane Differenz im Anteil intakter Zellen von 11 % und im Anteil an Zellschatten von 3 % (Tabelle 7). Der Anteil intakter Zellen sowie der Anteil an Zellschatten in Präparat 1 und Präparat 2 ergeben dabei mittels Spearman-Rho-Test eine positive Korrelation mit statistischer Signifikanz. Die grafische Darstellung (Abbildung 15 und 16) zeigt für einige Proben eine erhebliche Differenz von Präparat 1 und Präparat 2 bezüglich des Erhaltungszustands der Zellen, welche maximal 56 % im Anteil intakter Zellen und maximal 66 % im Anteil an Zellschatten beträgt.

IV.7 Variabilität in der Befundung

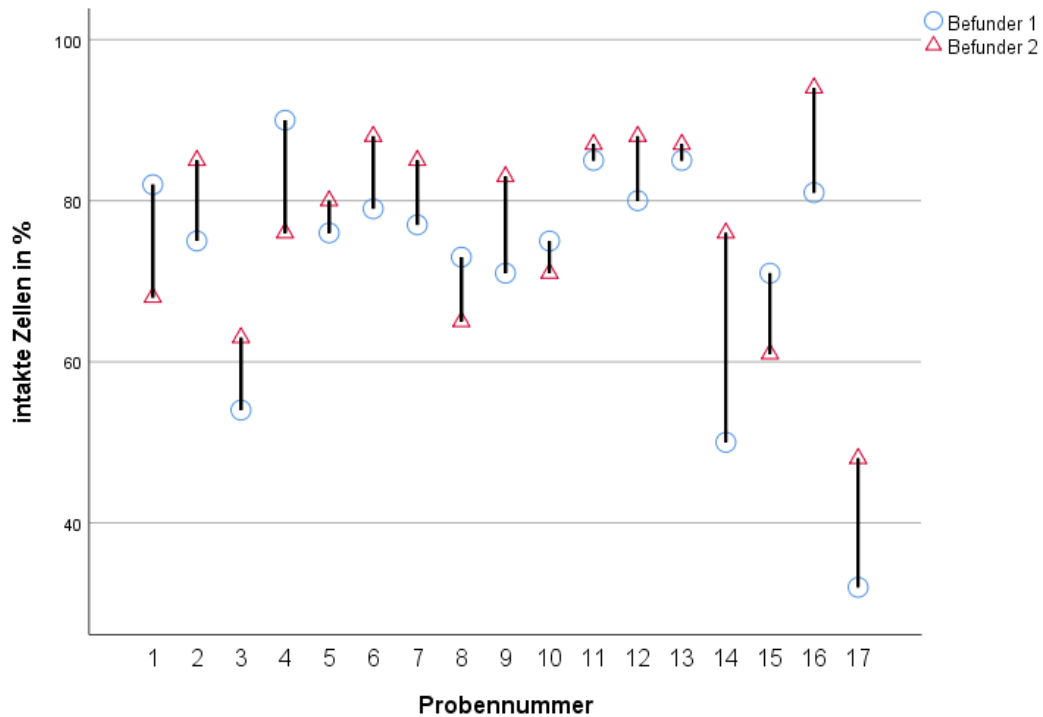


Abbildung 17: Anteil intakter Zellen von 17 Zytospinpräparaten ermittelt durch Befunder 1 und Befunder 2

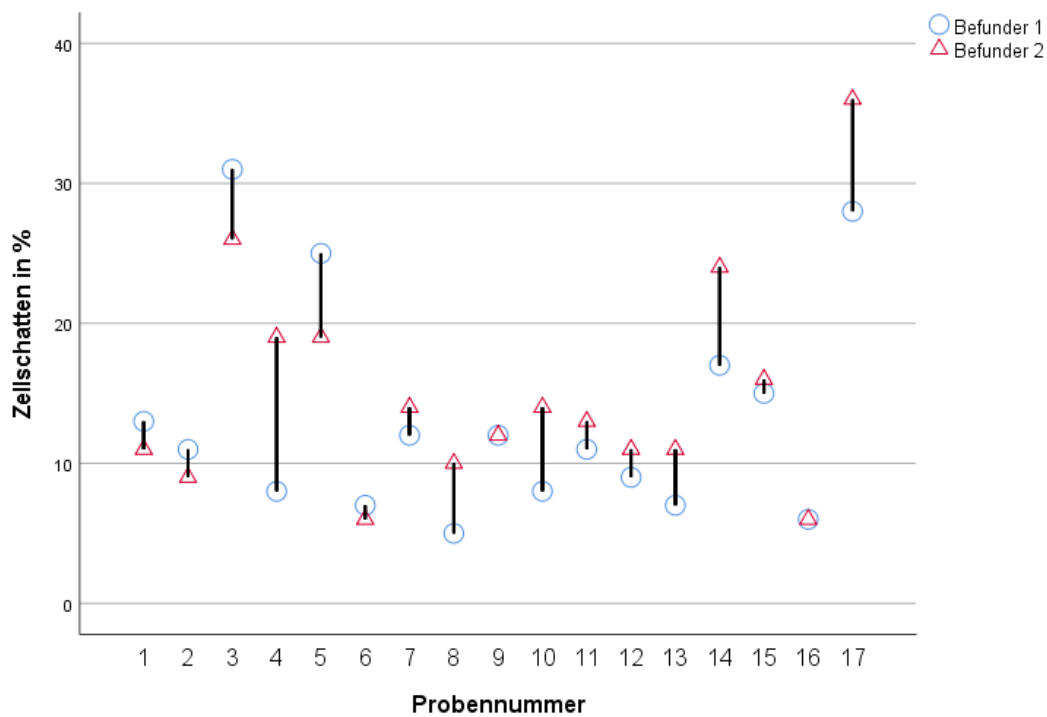


Abbildung 18: Anteil an Zellschatten von 17 Zytospinpräparaten ermittelt durch Befunder 1 und 2

	Anteil intakter Zellen (%)		Anteil Zellschatten (%)		Delta	
	Befunder 1	Befunder 2	Befunder 1	Befunder 2	Anteil intakter Zellen (%)	Anteil Zellschatten (%)
Median (25./75. Perzentile)	76 (71 / 81,5)	80 (66,5 / 87)	11 (7,5 / 16)	13 (10,5 / 19)	9 (6 / 13,5)	2 (1,5 / 6)
Minimum	32	48	5	6	2	0
Maximum	90	94	31	36	26	11
Korrelationskoeffizient*	0,607		0,767			
Sig. (2-seitig)*	0,010		0,000			

*Tabelle 8: 17 Zytospinpräparate wurden durch 2 Befunder unabhängig voneinander hinsichtlich des Anteils an intakten Zellen und Zellschatten begutachtet und die Ergebnisse korreliert (** die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig)).*

Zur Darstellung der Variabilität in der Beurteilung der Zellen durch unterschiedliche Befunder*innen sowie zur Validierung der Ergebnisse der Promovendin (Befunder 1) wurden 17 Zytospinpräparate von einer zweiten, in der Liquorzytologie sehr erfahrenen Befunderin (Befunder 2) zusätzlich hinsichtlich des Anteils intakter Zellen sowie des Anteils von Zellschatten beurteilt. Die Ergebnisse beider Befunderinnen zeigen eine statistisch signifikante positive Korrelation mittels Spearman-Rho-Test. Die mediane Abweichung hinsichtlich des Anteils intakter Zellelemente beträgt 9 % und hinsichtlich des Anteils an Zellschatten 2 %.

V. Diskussion

Die Untersuchung von Liquor cerebrospinalis ist ein wichtiger Baustein im Rahmen der diagnostischen Aufarbeitung von neurologischen, psychiatrischen und neurochirurgischen Krankheitsbildern und stellt eine häufig angewandte Methode dar. Die Bedeutung der Liquorzytologie ist insbesondere in der Abklärung von computertomografisch nicht nachweisbaren Subarachnoidalblutungen und von neoplastischen Erkrankungen mit Aussaat von Tumorzellen in die Liquorräume im Sinne einer Meningeosis neoplastica hervorzuheben. Eine exakte zytologische Beurteilung setzt dabei einen guten Erhaltungszustand der Zellen voraus, was jedoch eine besondere Herausforderung darstellt, da es sich bei Liquor cerebrospinalis um äußerst sensibles Probenmaterial handelt. Im Institut für Neuropathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin ist dies ebenfalls nachvollziehbar. Die begutachteten Liquorproben zeigen einen sehr variablen Erhaltungszustand und ein relativ großer Anteil der eingesandten Präparate ist aufgrund fortgeschrittener autolytischer Veränderungen nur noch eingeschränkt oder nicht mehr sicher beurteilbar. Im Rahmen von Qualitätsüberwachungen fiel auf, dass sich die große Variabilität im Erhaltungszustand der Zellen überwiegend nicht durch die Dauer des Probenverkehrs erklären lässt. Vielmehr fanden sich Hinweise darauf, dass die manuelle Handhabung der Proben im Labor sowie die Umgebungstemperatur einen wesentlichen Einfluss auf den Erhaltungszustand der Zellen haben. Dies zu objektivieren und den Einfluss weiterer bekannter präanalytischer Einflussfaktoren zu identifizieren ist Inhalt und Ziel der vorliegenden Arbeit.

Allgemein anerkannt ist, dass die Zellen im zeitlichen Verlauf degradieren und dass bereits 2 Stunden nach Abnahme relevante autolytische Veränderungen der Zellen zu einer Abnahme der Zellzahl und zu einem verfälschten Zellbild führen können (44; 48). Empfohlen werden daher ein schnellstmöglicher Versand und eine unmittelbare Anfertigung der Zytospinpräparate (40; 7). Überraschenderweise konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied im Erhaltungszustand der Zellen im Zeitverlauf von drei Stunden festgestellt werden (Tabelle 1). Der Anteil intakter Zellen war in Zytospinpräparaten, welche in der dritten Stunde nach Abnahme angefertigt wurden, genauso hoch wie in Zytospinpräparaten, welche innerhalb der ersten Stunde nach Punktion angefertigt wurden. Kritisch

anmerken kann man dabei, dass die experimentellen Bedingungen die Realität nur bedingt abbilden. Die Proben wurden aufrechtstehend in einem klimatisierten Labor bis zur Bearbeitung gelagert, während eine verzögerte Bearbeitung unter realen Bedingungen in der Regel durch einen langen Transport oder eine verspätete Abholung auf Station verursacht wird. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die negativen Effekte einer (zumindest geringen) Zeitverzögerung kompensiert werden können, indem andere negative Einflussfaktoren, wie hohe Umgebungstemperaturen oder Erschütterungen, minimiert werden. Ebenfalls muss berücksichtigt werden, dass insbesondere neutrophile Granulozyten in den ersten Stunden verloren gehen (44). Da in dieser Arbeit die Zellzusammensetzung der Proben nicht berücksichtigt wurde und da die Mehrheit der eingesandten Proben eine niedrige Zellzahl aufwies (Median = 3, 25./75. Perzentile = 1/11,25), ist davon auszugehen, dass nur wenige granulozytäre Präparate eingeschlossen wurden. Der Effekt der zeitlich verzögerten Bearbeitung von Proben im Rahmen von entzündlichen Prozessen ist hier somit nicht beurteilbar.

Hohe Umgebungstemperaturen beschleunigen die Degradierung der Zellen im Liquor, niedrige Temperaturen können eine sogenannte Kältelyse verursachen. In den ersten beiden Stunden nach Probengewinnung wird eine Umgebungstemperatur zwischen 5°C und 12°C als ideal angesehen. Dennoch wird der ungekühlte Versand als Standard angegeben. Kommt es zu zeitlichen Verzögerungen, wird eine Lagerung des Liquors im Kühlschrank empfohlen (40; 31). Obwohl sämtliche im Rahmen dieser Arbeit analysierten Proben innerhalb der ersten beiden Stunden nach Abnahme das Labor erreicht hatten, konnte bereits ein negativer Einfluss hoher Umgebungstemperaturen gezeigt werden. Die Tageshöchsttemperatur korrelierte invers mit dem Anteil an intakten Zellelementen und zeigte eine positive Korrelation mit dem Anteil an Zellen mit autolytischen Veränderungen (Tabelle 2). Bei maximalen Tagestemperaturen von über 30°C zeigte sich zusätzlich ein signifikant höherer Anteil an Zellschatten (Tabelle 3). Diese Ergebnisse sprechen für die Notwendigkeit einer strikteren Überwachung und Regulierung der Umgebungstemperatur. Insbesondere an heißen Sommertagen könnte der Erhaltungszustand und damit die Beurteilbarkeit der Liquorproben möglicherweise deutlich verbessert werden, wenn die Proben direkt im Anschluss an die Punktion gekühlt gelagert und transportiert werden würden. Dabei muss eine zu starke Kühlung der Proben unter Kühlschranktemperatur vermieden werden, weil dies ebenfalls zu einem vermehrten Auftreten von autolytischen Zellelementen führen kann. Ein negativer

Effekt sehr niedriger Außentemperaturen im Sinne einer sogenannten Kältelyse war in dieser Stichprobe jedoch nicht darstellbar. Allerdings konnten auch nur wenige Proben an sehr kalten Tagen eingeschlossen werden, sodass etwaige Effekte wahrscheinlich unterschätzt werden.

Obwohl ein negativer Einfluss von Erschütterungen der Probe auf den Erhaltungszustand der Zellen postuliert und ein Versand der Proben mittels Rohrpost nicht empfohlen wird (41), fanden sich keine Hinweise auf einen Einfluss des Transportbehältnisses auf den Erhaltungszustand der hier analysierten Proben. Der Anteil an Zellschatten sowie an intakten, autolytischen und artifiziellen Zellelementen war in beiden Gruppen nahezu gleich (Abbildung 12, Tabelle 4). Verglichen wurden Proben, welche stehend sowie vor Licht und Wärme geschützt in einer Styroporbox transportiert wurden, mit Proben, welche auf herkömmlichem Wege, in einer Plastiktüte liegend, durch einen Kurier das Labor erreichten. Allerdings ist die Aussagekraft dieser Untersuchung eingeschränkt, da ausschließlich Zytospinpräparate beurteilt wurden, welche innerhalb der ersten Stunde nach Abnahme angefertigt wurden. Auch wurden an sehr warmen und sehr kalten Tagen ($> 26^{\circ}\text{C}$ und $< 7^{\circ}\text{C}$) keine Proben in der Styroporbox transportiert. Ein möglicherweise positiver Effekt dieser Transportform auf den Erhaltungszustand der Zellen bei hohen oder niedrigen Außentemperaturen oder bei längeren Transportwegen mit verzögerter Anfertigung der Zytospinpräparate kann mithilfe der erhobenen Daten nicht beurteilt werden. Ebenfalls nicht berücksichtigt wurde der Füllstand der Probengefäße, welcher möglicherweise einen Einfluss auf den Erhaltungszustand der Zellen haben könnte. Vorstellbar ist, dass durch eine relativ größere Kontaktfläche mit der Luft in kleinvolumigen Liquorproben zu einer vermehrten Reaktion des Liquors mit dem Sauerstoff der Luft und damit zu beschleunigten katabolen Prozessen führt (40). Auch ist vorstellbar, dass ein kleines Probenvolumen in einem relativ großen Probengefäß, zumindest bei herkömmlichem Transport, stärkeren physikalischen Einflüssen ausgesetzt ist, sodass die Zellen beispielsweise stärker und häufiger am Gefäß anprallen.

Der im Vergleich zu Blut deutlich niedrigere Eiweißgehalt im Liquor gilt als ein wichtiger Grund dafür, dass Zellen im Liquor schneller degradieren (42). Diese Annahme wird bestätigt durch die Tatsache, dass die Zugabe von Rinderserumalbumin die Zellen während der Zentrifugation stabilisiert (43). Dass ein initial höherer Eiweißgehalt der

Proben zu einem höheren Anteil an intakten Zellelementen führt, ließ sich anhand der eingeschlossenen Proben jedoch nicht reproduzieren (Tabelle 5). Allerdings zeigte sich eine statistisch signifikante inverse Korrelation zwischen dem Eiweißgehalt der Proben und dem Anteil an Zellschatten (Abbildung 13). Die nicht mehr intakten Zellelemente lagen also in Proben mit niedrigerem Eiweißgehalt häufiger als Zellschatten vor. Da Zellschatten die am weitesten fortgeschrittene Form der Zelldegradierung darstellen, kann man mutmaßen, dass das Eiweiß in der Probe die weitere Degradierung der autolytischen Zellen verlangsamt hat. Die Ergebnisse unterstreichen zusammengefasst den Nutzen der Zugabe von Rinderserumalbumin vor Zentrifugation. Auch hier ist als Limitation anzugeben, dass der mediane Eiweißgehalt der Proben bei 388 mg/l und damit im Normalbereich lag. Es wurden nur wenige Proben mit hohem Eiweißgehalt eingeschlossen, sodass der Einfluss möglicherweise unterschätzt wird.

Eine schwache, jedoch statistisch signifikante inverse Korrelation zeigte sich darüber hinaus zwischen dem Lactatgehalt der Proben und dem Anteil an Zellschatten (Abbildung 13). Da erhöhte Lactatwerte im Rahmen von Hypoxien und anderen Erkrankungen mit anaerobem Glucosestoffwechsel und vermehrtem Zelluntergang auftreten (31), lässt sich diese Beobachtung nicht gut erklären. Vielmehr würde man in Proben mit erhöhtem Lactatgehalt einen höheren Anteil an Zellschatten erwarten. Auch hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass der mediane Lactatgehalt der Proben im unteren Normalbereich lag (1,6 mmol/l) und nur wenige Proben mit deutlich erhöhtem Lactatgehalt untersucht wurden. Der mediane Glucosegehalt der untersuchten Proben betrug 63 mg/dl und lag damit ebenfalls in dem vom Labor angegebenen Referenzbereich von 40 – 70 mg/dl. Ein Zusammenhang zwischen dem Glucosegehalt der Proben und dem Erhaltungszustand der Zellen stellt sich nicht dar. Zusammenfassend erklärt der Gehalt an Eiweiß, Lactat und Glucose nicht die schwankende Beurteilbarkeit der untersuchten Liquorproben.

Sehr eindrücklich war der Einfluss der manuellen Handhabung der Proben durch das Laborpersonal auf den Erhaltungszustand der Zellen (Abbildung 14). 16 Liquorproben wurden geteilt und zeitgleich in zwei verschiedenen Laboren entsprechend derselben Verfahrensanweisungen bearbeitet. In Labor 1 wurden die Zytospinpräparate von der Promovendin selbst sowie von einer auf Liquor spezialisierten und sehr erfahrenen medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin (MTLA) angefertigt. In Labor 2 waren

5 Laborant*innen beteiligt. Die in Labor 2 angefertigten Zytospinpräparate zeigten einen deutlich höheren Anteil an autolytischen Zellelementen und Zellschatten, während der Anteil an intakten Zellen in Präparaten aus Labor 1 deutlich höher war (Tabelle 6). Obwohl nur 16 Proben untersucht wurden, zeigte sich ein deutlicher und statistisch signifikanter Unterschied. Die sorgsame Handhabung der Proben durch gut geschultes Personal scheint essentiell zu sein für die Qualität der Zytospinpräparate. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass lediglich der Zeitpunkt der Ankunft der Probe im Labor erfasst wird. Die Anfertigung der Zytospinpräparate kann mit erheblicher zeitlicher Verzögerung erfolgen. Das Personal in Labor 2 bediente neben dem „Liquorplatz“ weitere Arbeitsplätze im Labor, was eine unmittelbare Bearbeitung der Liquorproben teilweise unmöglich machte. Daher stellt sich die Frage, ob neben einer sorgsamem Handhabung der Proben auch die unmittelbare Bearbeitung im Labor ein relevanter Einflussfaktor sein kann. Diese Frage kann anhand der erhobenen Daten jedoch nicht beantwortet werden.

Um die Ergebnisse der Zellzählungen zu validieren, wurden 17 zufällig ausgewählte Präparate bezüglich des Anteils an intakten Zellen und Zellschatten von einer sehr erfahrenen und durch Ringversuche bestätigten unabhängigen Befunderin beurteilt. Hierbei konnte eine statistisch signifikante Korrelation der Ergebnisse gezeigt werden. Dennoch ergaben sich mediane Abweichungen der Ergebnisse von 9 % im Anteil intakter Zellen sowie von 2 % im Anteil an Zellschatten (Tabelle 8). Dies verdeutlicht, dass die mikroskopische Zelldifferenzierung auch subjektiven Bewertungsmaßstäben unterliegt. Die Degradierung der Zellen erfolgt entlang eines Kontinuums, die Abgrenzung einer noch intakten Zelle von einer beginnend autolytischen Zelle sowie einer fortgeschritten autolytischen Zelle von einem Zellschatten ist nicht immer sicher möglich. Ebenfalls ist die sichere Abgrenzung von artifiziellen und autolytischen Veränderungen der Zellen teils schwierig oder unmöglich. Verdichtungen und Verklumpungen des Kernchromatins gelten als artifizielle Veränderungen, welche im Rahmen von Zentrifugationsverfahren beobachtet werden (48). Die Beobachtungen dieser Arbeit bestätigen diese Annahme, denn es zeigte sich kein Einfluss der untersuchten Variablen, wie beispielsweise der Umgebungstemperatur oder der manuellen Handhabung, auf den Anteil an artifiziellen Zellelementen. Zellschatten hingegen werden zu den sicheren Zeichen autolytischer Veränderungen gezählt (43), dementsprechend wurde der Anteil an Zellschatten von der Umgebungstemperatur, der

manuellen Handhabung im Labor sowie von dem Eiweißgehalt der Probe beeinflusst. Eine Ausbreitung und Ablassung von Zellen wird jedoch in beiden Zusammenhängen diskutiert und im Rahmen der zeitintensiveren Sedimentationsverfahren als Ausdruck der Autolyse (50; 51), im Rahmen der Zentrifugationstechniken als Artefakt angesehen (48). Es ist somit nicht auszuschließen, dass der Anteil autolytisch veränderter Zellelemente in den untersuchten Proben überschätzt wird und dass unvermeidbaren Zellartefakten, welche bei der Herstellung der Zytospinpräparate auftreten, eine zu große Bedeutung beigemessen wurde.

Wenn genügend Probenmaterial zur Verfügung steht, werden von jeder Liquorprobe zeitgleich mindestens 2 Zytospinpräparate angefertigt. Um einen Eindruck von den natürlichen Schwankungen in Bezug auf den Erhaltungszustand der Zellen innerhalb einer Probe zu bekommen, wurden von 54 Proben diese beiden zeitgleich angefertigten Präparate miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass der Anteil an intakten Zellen um 11 %, der Anteil an Zellschatten um 3 % abwich (Tabelle 8). Diese Variabilität innerhalb einer Probe sowie die ermittelte Variabilität in der Beurteilung des Erhaltungszustandes der Zellen durch den Vergleich der Ergebnisse von 2 Befunderinnen relativieren möglicherweise den Einfluss der manuellen Handhabung durch das Laborpersonal. Die mediane Abweichung im Anteil intakter Zellen zwischen Labor 1 und Labor 2 betrug 17,5 %, die mediane Abweichung im Anteil an Zellschatten betrug 8 %. Subtrahiert man die mediane Abweichung von 11 % für intakte Zellen und von 3 % für Zellschatten innerhalb einer Probe, liegt die korrigierte mediane Abweichung von Labor 1 und Labor 2 für intakte Zellen bei 6,5 % und für Zellschatten bei 5 %. Diese Abweichungen sind, auch unter Berücksichtigung der Variabilität in der Beurteilung (mediane Abweichung für intakte Zellen 9 %, Zellschatten 2 %), als eher geringfügig einzuordnen.

Zusammenfassend lassen sich aus den dargelegten Studienergebnissen einzelne Empfehlungen ableiten, welche die Qualität und damit die Beurteilbarkeit von Zytospinpräparaten möglicherweise verbessern können. Da die manuelle Handhabung der Proben durch das Laborpersonal einen signifikanten Einfluss auf den Erhaltungszustand der Zellen im Liquor zu haben scheint, sollten die personelle Ausstattung der Labore sowie die Qualifikation der einzelnen Mitarbeiter*innen in den Blick genommen werden. Das Laborpersonal sollte regelmäßig im Umgang mit diesem sensiblen Probenmaterial geschult werden. Auch sollte jederzeit ausreichend Personal

im Einsatz sein, um eine unmittelbare und gewissenhafte Bearbeitung der Liquorproben zu ermöglichen. Es sollte erwogen werden, den durchgeführten Versuch unter IV.5 „Einfluss der manuellen Handhabung“ nach erfolgten Schulungsmaßnahmen zu wiederholen. Die Ergebnisse mehrerer Präsenzlabore könnten, ähnlich einem Ringversuch, miteinander verglichen werden. Darüber hinaus sollten die tatsächlichen Umgebungstemperaturen, welchen die Proben in der präanalytischen Phase ausgesetzt sind, erfasst werden, da in der vorliegenden Studie lediglich die maximalen Außentemperaturen am Tag der Punktion dokumentiert wurden. Aufgrund der Ergebnisse empfiehlt sich in jedem Fall eine Kühlung der Proben während des Transports an Tagen mit Außentemperaturen über 30°C.

VI. Literaturverzeichnis

1. Johanson CE, Duncan JA, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. *Cerebrospinal fluid research*. 2008;5(1):1-32.
2. Sakka L, Coll G, Chazal J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2011;128(6):309-16.
3. Spector R, Robert Snodgrass S, Johanson CE. A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. *Exp Neurol*. 2015; 273:57-68.
4. Quincke H. *Berliner klinische Wochenschrift: Die Lumbalpunktion des Hydrocephalus*: August Hirschwald; 1891.
5. Wynter WE. Four cases of tubercular meningitis in which paracentesis of the theca vertebralis was performed for the relief of fluid pressure. *The Lancet*. 1891;137(3531):981-2.
6. Zambito Marsala S, Gioulis M, Pistacchi M. Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: the story of a necessary procedure in the history of medicine. *Neurol Sci*. 2015;36(6):1011-5.
7. Tumani H, Petereit H, Gerritzen A. Lumbalpunktion und Liquordiagnostik. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie der DGN. 2019
8. Klein M, Bühler R, Eiffert H, Grabein B, Linn J, Nau R. Ambulant erworbene bakterielle (eitrige) Meningoenzephalitis im Erwachsenenalter. *Aktuelle Neurologie*. 2016;43(06):358-68.
9. Bohr V, Rasmussen N, Hansen B, Kjersem H, Jessen O, Johnsen N, Kristensen H S. 875 cases of bacterial meningitis: diagnostic procedures and

- the impact of preadmission antibiotic therapy Part III of a three-part series. *Journal of Infection*. 1983;7(3):193-202.
10. van de Beek D, Cabellos C, Dzunpova O, Esposito S, Klein M, Kloek A, Leib S L, Mourvillier B, Ostergaard C, Pagliano P, Pfister H W, Read R C, Resat Sipahi O, Bower M C. ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis. *Clinical microbiology and infection*. 2016;22: S37-S62.
 11. Liesman RM, Strasburg AP, Heitman AK, Theel ES, Patel R, Binnicker MJ. Evaluation of a commercial multiplex molecular panel for diagnosis of infectious meningitis and encephalitis. *Journal of clinical microbiology*. 2018;56(4).
 12. Reiber H, Ungefehr S, Jacobi C. The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 1998;4(3):111-7.
 13. Ruprecht K, Tuman H. Liquordiagnostik bei Multipler Sklerose. *Der Nervenarzt*. 2016;87(12):1282-7.
 14. Petridis AK, Kamp MA, Cornelius JF, Beez T, Beseoglu K, Turowski B, Steiger H-J. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Dtsch Arztebl Int*. 2017;114(13):226-36.
 15. Zettl UK, Lehmitz R, Mix E. *Klinische Liquordiagnostik: Walter de Gruyter*; 2005.
 16. Tuman H, Petzold A, Wick M, Kühn H-J, Uhr M, Otto M, Regeniter A, Brettschneider J. Liquordiagnostik bei CT-negativer Subarachnoidalblutung. *Der Nervenarzt*. 2010;81(8):973-9.
 17. Kolodziej MA, Proemmel P, Quint K, Strik HM. Cerebrospinal fluid ferritin—unspecific and unsuitable for disease monitoring. *Neurologia i neurochirurgia polska*. 2014;48(2):116-21.

18. Wick M, Gross C, Isenmann S, Strik H. Liquorzytologie. *Der Nervenarzt*. 2016;87(12):1276-81.
19. Vickers A, Donnelly JP, Moore JX, Barnum SR, Schein TN, Wang HE. Epidemiology of lumbar punctures in hospitalized patients in the United States. *PLoS One*. 2018;13(12): e0208622.
20. Popp J, Riad M, Freymann K, Jessen F. Ambulante Durchführung einer diagnostischen Lumbalpunktion in der Gedächtnissprechstunde. *Der Nervenarzt*. 2007;78(5):547.
21. Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Öhrfelt A, Portelius E, Bjerke M, Hölttä M, Rosén C, Olsson C, Strobel G, Wu E, Dakin K, Petzold M, Blennow K, Zetterberg H. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*. 2016;15(7):673-84.
22. Abel AS, Brace JR, McKinney AM, Friedman DI, Smith SD, Westesson PL, Nascene D, Ott F, Lee M. Effect of patient positioning on cerebrospinal fluid opening pressure. *J Neuroophthalmol*. 2014;34(3):218-22.
23. Schneeberger PM, Janssen M, Voss A. Alpha-hemolytic streptococci: a major pathogen of iatrogenic meningitis following lumbar puncture. Case reports and a review of the literature. *Infection*. 1996;24(1):29-33.
24. Evans RW. Complications of lumbar puncture. *Neurologic clinics*. 1998;16(1):83-105.
25. Bezov D, Lipton RB, Ashina S. Post-dural puncture headache: part I diagnosis, epidemiology, etiology, and pathophysiology. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2010;50(7):1144-52.
26. Pellot JE, De Jesus O. Suboccipital Puncture. *StatPearls [Internet]*. 2020.

27. Williams MA, Malm J. Diagnosis and Treatment of Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2016;22(2 Dementia):579-99.
28. Hoffmann J, Mollan SP, Paemeleire K, Lampl C, Jensen RH, Sinclair AJ. European headache federation guideline on idiopathic intracranial hypertension. *J Headache Pain*. 2018;19(1):93.
29. Nagy K, Skagervik I, Tumani H, Petzold A, Wick M, Kuhn HJ, Mattsson N. Cerebrospinal fluid analyses for the diagnosis of subarachnoid haemorrhage and experience from a Swedish study. What method is preferable when diagnosing a subarachnoid haemorrhage? *Clin Chem Lab Med*. 2013;51(11):2073-86.
30. Kleine TO. *Neue Labormethoden für die Liquordiagnostik*: Thieme; 1980.
31. Wick M. *Ausgewählte Methoden der Liquordiagnostik und Klinischen Neurochemie*. Deutsche Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie e.V. 2020.
32. Kleine T. Mechanisierte Zählung und Differenzierung von Liquorzellen. *LaboratoriumsMedizin/Journal of Laboratory Medicine*. 1991;15(2):51-60.
33. Li A, Grönlund E, Brattsand G. Automated white blood cell counts in cerebrospinal fluid using the body fluid mode on the platform Sysmex XE-5000. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2014;74(8):673-80.
34. Breiner A, Moher D, Brooks J, Cheng W, Hegen H, Deisenhammer F, McCudden C, Bourque P. Adult CSF total protein upper reference limits should be age-partitioned and significantly higher than 0.45 g/L: a systematic review. *J Neurol*. 2019;266(3):616-24.

35. Hegen H, Auer M, Zeileis A, Deisenhammer F. Upper reference limits for cerebrospinal fluid total protein and albumin quotient based on a large cohort of control patients: implications for increased clinical specificity. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2016;54(2):285-92.
36. Kleine T. D-Lactat und L-Lactat im Liquor cerebrospinalis bei akuten entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS). *LaboratoriumsMedizin/Journal of Laboratory Medicine*. 1991;15(2):114-6.
37. Hegen H, Auer M, Deisenhammer F. Serum glucose adjusted cut-off values for normal cerebrospinal fluid/serum glucose ratio: implications for clinical practice. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2014; 52(9):1335-40.
38. Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Fredrikson S, Gronning M, Keir G, Lamers K, Link H, Magalhaes A, Massaro A R, Öhman S, Schlupe M, Schuller E, Sindic CJM, Thompson EJ, Trojano M, Wurster U. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1994;57(8):897-902.
39. Kleine TO, Nebe CT, Löwer C, Geilenkeuser WJ, Dorn-Beineke A. Cell analysis in cerebrospinal fluid (CSF) using Sysmex® hematology analyzers XT-4000i and XE-5000: Evaluation with CSF controls of the Joint German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL). *Cytometry Part A*. 2012;81(3):255-64.
40. Kluge H. *Atlas of CSF cytology*: Georg Thieme Verlag; 2007.
41. Isenmann S, Strik H, Wick M, Gross CC. Liquorzytologie: Methoden und Möglichkeiten. *Fortschritte der Neurologie· Psychiatrie*. 2017; 85(10):616-30.

42. Schwarz G. Zellmorphologie und Zellausbeute bei einer neuen Zytozentrifugentechnik mit gleichzeitiger Gewinnung von zellfreiem Überstand. *LaboratoriumsMedizin/Journal of Laboratory Medicine*. 1991; 15(2):45-50.
43. Lehmitz R, Kleine T. Liquorzytologie: Ausbeute, Verteilung und Darstellung von Leukozyten bei drei Sedimentationsverfahren im Vergleich zu drei Zytozentrifugen-Modifikationen. *LaboratoriumsMedizin/Journal of Laboratory Medicine*. 1994; 18(3):91-9.
44. Steele RW, Marmer DJ, O'brien MD, Tyson ST, Steele CR. Leukocyte survival in cerebrospinal fluid. *Journal of clinical microbiology*. 1986;23(5):965-6.
45. Plebani M. The detection and prevention of errors in laboratory medicine. *Annals of clinical biochemistry*. 2010; 47(2):101-10.
46. Hawkins R. Managing the pre- and post-analytical phases of the total testing process. *Ann Lab Med*. 2012; 32(1):5-16.
47. Dursun E, Alaylıoğlu M, Bilgiç B, Hanağası H, Gürvit H, Emre M, Gezen-Ak D. Amyloid Beta adsorption problem with transfer plates in amyloid Beta 1–42 IVD kits. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2019; 67(4):534-9.
48. Kölmel H, Welke J. Ausbeute und Morphologie von Liquorzellen mit der Hettich Zytokammer. *LaboratoriumsMedizin/Journal of Laboratory Medicine*. 1993; 17(6):291-305.
49. Ducos R, Donoso J, Weickhardt U, Vietti TJ. Sedimentation versus cytozentrifugation in the cytologic study of craniospinal fluid. *Cancer*. 1979; 43(4):1479-82.
50. Sayk J. Cytologie der Cerebrospinalflüssigkeit: Ergebnisse vergleichender Untersuchungen: G. Fischer; 1960.

51. Sörnäs, R. A new method for the cytological examination of the cerebrospinal fluid. *J Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1967;30, 568-577.

VII.2 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Anja Osterloh, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Studie zur Bestimmung präanalytischer Einflussfaktoren auf die Liquorzellstabilität (Study to determine preanalytical influencing factors on CSF cell stability)

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

VII.3 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

VII.4 Danksagung

Mein Dank geht zuerst an Prof. Dr. med. Frank Heppner, welcher mich mit dem Thema betraut und mir die Möglichkeit gegeben hat, die Arbeit im Rahmen meiner Weiterbildungszeit im Institut für Neuropathologie zu erstellen.

Bedanken möchte ich mich insbesondere bei Liane Barnick, welche mir mit ihrer großen Erfahrung und Expertise in der Liquordiagnostik sowie ihrer herzlichen und ermutigenden Art stets zur Seite stand und so zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Ich danke auch Janine Heyder für das gewissenhafte Korrekturlesen und die sehr hilfreichen Verbesserungsvorschläge.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei den Laborantinnen und Laboranten von Labor Berlin am Campus Mitte der Charité – Universitätsmedizin Berlin für die kompetente Anleitung am Durchflusszytometer sowie bei der Anfertigung von Zytospinpräparaten.

Ein besonderer Dank richtet sich an Prof. Dr. med. Klemens Ruprecht, welcher die Studie bei den Kolleginnen und Kollegen der Klinik für Neurologie am Campus Mitte der Charité – Universitätsmedizin Berlin propagiert und mir damit Zugang zu diesem raren Probenmaterial verschafft hat.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Neuropathologie sowie bei meiner Familie und meinen Freunden für viele ermunternde Worte und zahlreiche Unterstützungsangebote.