

MedReview

Die Zeitschrift für ärztliche Fortbildungskongresse

DIFFERENZIERTE DIAGNOSTIK

OSNA – die neue intraoperative Routine der Sentineldiagnostik

NICOLAI MAASS, KIEL

Mit einer sicheren intraoperativen Analyse des Sentinel-Lymphknotens kann bereits während des ersten Eingriffes eine Entscheidung über das weitere chirurgische Vorgehen gefällt und somit Zweitoperationen eingespart werden. Allerdings kann heute mit den konventionell angewendeten Verfahren (Gefrierschnitt oder Imprint-Zytologie mit anschließender Hämatoxylin-Eosin-(H&E)-Färbung) in der begrenzten Zeit, die während des Eingriffes zur Verfügung steht, nur ein kleiner Teil des Lymphknotens analysiert werden.

Dies führt zu einer reduzierten Sensitivität der Analyse und einer aus der Literatur zu entnehmenden falsch negativen Rate von 5–52 %, was für die Patientinnen bedeutet, dass erst nach der postoperativen

Die Sentinel-Lymphknotenbiopsie wird zunehmend zur operativen Methode der Wahl bei Patientinnen mit Brustkrebs in einem frühen Stadium und klinisch negativem Lymphknotenbefund. Das Ziel dieses Vorgehens ist es, die Anzahl der axillären Dissektionen und die mit diesem radikalen Eingriff einhergehende Morbidität der Patientinnen zu minimieren. Darum wird nur im Falle eines metastatischen Befalles des Sentinel-Lymphknotens (Wächterlymphknoten) eine vollständige Entfernung aller axillären Lymphknoten durchgeführt.

vollständigen histopathologischen Untersuchung des Lymphknotens eine verlässliche Diagnose gestellt werden kann. Aus diesem Grund muss sich ein gewisser Prozentsatz der Patientinnen noch einer zweiten Operation unterziehen. Die Ursache der hohen Schwankungsbreite ist darin begründet, dass die Analyse der Lymphknoten, sowohl intraoperativ als auch postoperativ, bis heute nicht standardisiert ist.

Neues Routineverfahren

An unserem Zentrum in Kiel haben wir im Rahmen einer klinischen Studie zusammen mit dem Albertinen-Krankenhaus (Hamburg) nachgewiesen, dass heute mit einem neuen molekularbiologischen Diagnostikverfahren intraoperativ die Sensitivität und Spezifität einer sehr exakten postoperativen histopathologischen Untersuchung erzielt werden kann.



Prof. Dr.
Nicolai Maass



Abb. 1: RD-100i, Automat zur Amplifikation und Detektion.

Charakteristika des neuen intraoperativen Verfahrens

- Nachweis von Zytokeratin 19 mRNA.
- Kurze Amplifikationszeit von 16 Minuten.
- Keine Isolierung der RNA notwendig.
- Sensitivität und Spezifität sind vergleichbar mit einem sehr genauen und zeitintensiven histopathologischen Verfahren.
- Unterscheidung zwischen Makro- und Mikrometastasen bzw. negativen Lymphknoten.
- Automatisierung über den RD-100i.

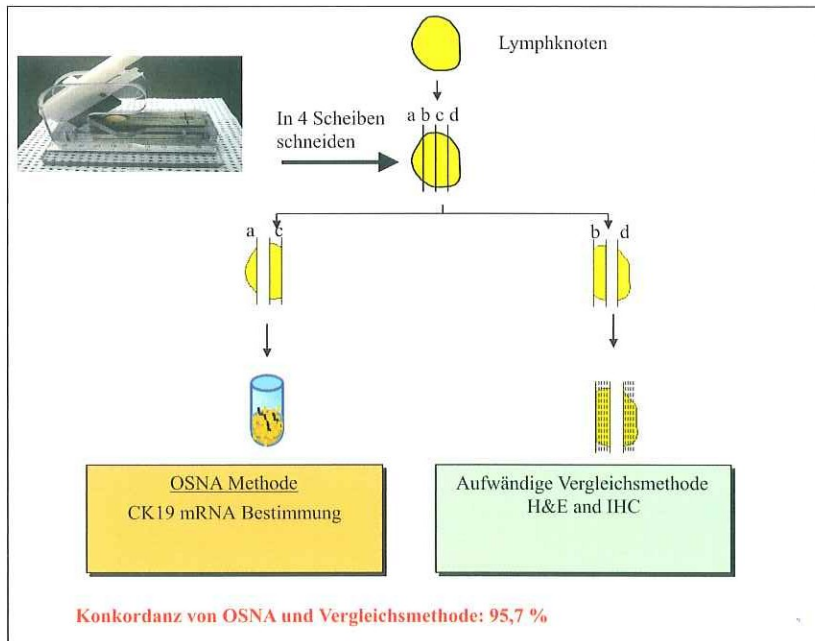


Abb 2: Studien Design.

Dieses Verfahren, genannt OSNA (One Step Nucleic acid Amplification der Sysmex Corporation), basiert auf dem Nachweis der mRNA von Zytokeratin 19, einem Marker für Epithelzellen, die in metastasefreien Lymphknoten normalerweise nicht vorkommen. Vor der Amplifikationsreaktion muss der Lymphknoten vom umgebenden Fettgewebe befreit und homogenisiert werden. Die Amplifikation und Detektion der CK19 mRNA wird vollautomatisch vom einem Gerät (RD-100i) durchgeführt (Abb. 1). Das Gerät ist einfach zu bedienen, so dass molekularbiologische Vorkenntnisse nicht notwendig sind. Die Amplifikation erfolgt in 16 Minuten über ein isothermes Verfahren (RT-LAMP^{*}) und kann auf dem Gerät in „Real-Time“ überwacht werden.

Die gesamte Analysezeit beträgt etwa 30 Minuten, vom Eintreffen des Lymphknotens bis zum Abschluss der Reaktion.

Der OSNA-Test bestimmt quantitativ die Menge an CK19 mRNA, die direkt mit der Größe der Metastasen korreliert. Da der Test die Untersuchung des kompletten Lymphknotens erlaubt, wird mittels OSNA die tatsächliche Größe der metastatischen Herde in einem Lymphknoten analysiert; d. h. es wird zwischen Makro- und

Mikrometastasen bzw. fehlenden Metastasen unterschieden. Die Ergebnisse sind in drei Kategorien dargestellt: Makrometastasen (++) , Mikrometastasen (+) und negative Lymphknoten (-), so dass eine direkte intraoperative Entscheidung ermöglicht wird.

Studien Design in Kiel

Die OSNA-Methode wurde bei uns am Zentrum in Kiel an 342 Lymphknoten durchgeführt und mit einer ausführlichen histopathologischen Untersuchung verglichen. Zu diesem Zweck wurden die Lymphknoten von axillären Dissektionen unmittelbar nach der Entnahme geviertelt und je zwei Viertel histopathologisch bzw. molekularbiologisch untersucht (Abb. 2). Für die histopathologische Vergleichsmethode wurden in fünf Stufen jeweils drei Gewebeschnitte mit einem Abstand von 100 µm angefertigt, die mit H&E oder immunohistochemisch (pan-Zytokeratin-Antikörper LU5 und CK19-spezifischer Antikörper) gefärbt wurden.

Ergebnisse

Der Vergleich zwischen OSNA und der histopathologischen Untersuchung zeigte eine Übereinstimmung der Methoden von 91,9 % (316/344) und eine Sensitivität von 98,1 %. Aufgrund des Vorhandenseins von kleineren Metastasen in

nur einem Gewebesegment ist ein bestimmter Prozentsatz an diskordanten Ergebnissen zu erwarten. Zur Bestätigung dessen wurde in den diskordanten Fällen der komplette Lymphknoten in 100 µm-Stufen aufgearbeitet, um alle eventuell vorliegenden Mikrometastasen zu detektieren. Des Weiteren wurde eine QRT-PCR zum Nachweis der mRNA von drei Markergenen durchgeführt, die entweder spezifisch für Epithel- oder Tumorzellen sind (CK19, SPDEF- und FOXA1) sowie ein Western Blot, um das CK19-Protein nachzuweisen. Auf diese Weise konnten 14 diskordante Ergebnisse eindeutig mit einer ungleichen Metastasenverteilung erklärt und von der Analyse ausgeschlossen werden. Nach Ausschluss der diskordanten Fälle wurde somit eine Konkordanz von 95,7 %, eine Spezifität von 96,5 % und eine Sensitivität von 100 % erreicht. In den übrigen diskordanten Fällen konnte entweder keine intakte RNA mehr aus dem OSNA-Lysat isoliert werden bzw. war es nicht auszuschließen, dass in den verworfenen 100 µm-Stufen Metastasen unentdeckt blieben.

Résumé

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass OSNA – basierend auf der Detektion von CK19 mRNA – eine exzellente automatisierte und standardisierte Methode zur intraoperativen Detektion von Lymphknotenmetastasen beim Mammakarzinom darstellt. Durch den Einsatz von OSNA könnte die Anzahl an Zweitoperationen weiter reduziert werden. Wir werden bei uns in Kiel zukünftig OSNA im intraoperativen routinemäßigen Einsatz im Rahmen des Sentinelkonzeptes testen.

* RT-LAMP = Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification; licensed under the agreement with EIKEN CHEMICAL CO.: LTD

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Nicolai Maass
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Kiel
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
Michaelisstr. 16, 24105 Kiel
nmaas@email.uni-kiel.de