

Minimalinvasive Bürstenbiopsie

*Innovative Methode zur Früherkennung oraler
Plattenepithelkarzinome*

Torsten W. Remmerbach^{1,2}, Alexander Hemprich²,
Alfred Böcking³

¹ Lehrstuhl für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. T. Remmerbach), Griffith University,
School of Dentistry and Oral Health, 16–30 High Street,
Southport, Queensland, Australien.

² Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische
Gesichtschirurgie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Hemprich),
Universität Leipzig, Nürnberger Strasse 53, D-04103 Leipzig

³ Institut für Cytopathologie (Direktor: Univ.-Prof.
Dr. A. Böcking), Medizinische Einrichtungen der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Moorenstrasse 5,
D-40226 Düsseldorf

Korrespondenzadresse:
Prof. Dr. Torsten W. Remmerbach,
Gold Coast Campus, School of Dentistry & Oral Health,
Griffith University 4222, Queensland, Australia

(Texte français voir page 936)

Einleitung

Die Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle gehören weltweit zu den sechs häufigsten Tumoren des Menschen und machen nach dem Surveillance, Epidemiology and End Result Program of the National Cancer Institute of the United States Public Health Service (CARVALHO et al. 2005) etwa 95% aller bösartigen Erkrankungen des Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereichs aus. Neue chirurgische, strahlen- sowie chemotherapeutische Methoden sind verfügbar, dennoch ist es nicht gelungen, die Fünfjahres-

überlebensrate signifikant zu verbessern. So stirbt innerhalb dieses Beobachtungszeitraumes immer noch durchschnittlich die Hälfte der erkrankten Patienten. Eine wichtige Ursache dieses Dilemmas stellt der zu späte Therapiebeginn dar. Kurative Behandlungsmöglichkeiten bestehen vor allem im frühen Stadium dieser Erkrankung und somit ist die Tumorgrosse für die Prognose des Patienten von entscheidender Bedeutung. Die Überlebenschance von Tumoren, die kleiner als 2 cm sind, steigt auf 80% in den ersten fünf Jahren. Wenn aber bereits Nachbarstrukturen befallen oder Metastasen in lokoregionären Lymphknoten

In diesem Fortbildungsartikel werden die diagnostischen Möglichkeiten der oralen Exfoliativzytologie und der DNA-Bildzytometrie zur Früherkennung oraler Malignome vorgestellt. Dazu wurde in einer prospektiven Studie die diagnostische Treffsicherheit beider Methoden im Vergleich zur konventionellen Histologie bei Veränderungen der Mundhöhle an suspekten Läsionen von 332 Patienten untersucht, wobei es sich in 92 Fällen um Patienten mit einem klinisch manifesten Plattenepithelkarzinom handelte. So erzielte die konventionelle zytologische Diagnostik gemessen am «Goldstandard» Histologie eine Sensitivität von 91,3%, die Spezifität lag bei 95,1%. Vergleicht man die Zytologie in Kombination mit der DNA-Zytometrie mit der Histologie, so lag die Sensitivität bei 97,8%, die Spezifität bei 100%. Die Exfoliativzytologie der Mundschleimhaut als minimalinvasives, einfach zu handhabendes, preiswertes, den Patienten in keiner Weise belastendes Verfahren ist als adjuvante Untersuchungstechnik zur Beurteilung der Dignität von unklaren Mundschleimhautveränderungen geeignet. Dieses Verfahren erfüllt alle Voraussetzungen, um als sekundäre Targeting-Screening-Methode in der zahnärztlichen Praxis eingesetzt zu werden.

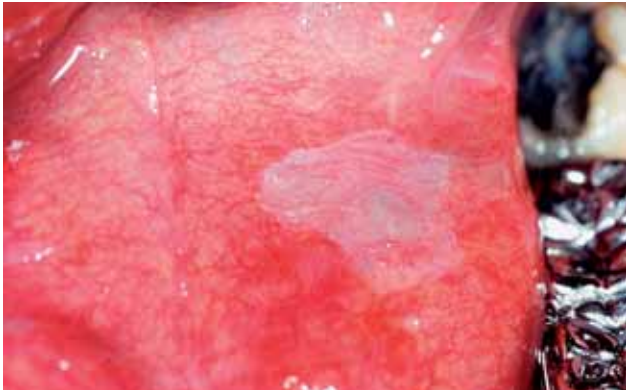


Abb. 1 Indikation für eine Bürstenbiopsie: Das Bild zeigt eine homogene Leukoplakie im Bereich des Mundbodens linksseitig.

Fig. 1 Indication à la biopsie par brosse: l'image montre une leucoplasie homogène au niveau du plancher buccal à gauche.



Abb. 2 Indikation für eine Bürstenbiopsie: Das Bild zeigt eine inhomogene, in der Textur unruhige, stellenweise erhabene (Erythro-) Leukoplakie der linken Wange.

Fig. 2 Indication à la biopsie par brosse: l'image montre une (érythro-) leucoplasie inhomogène, de texture irrégulière et surélevée par place, au niveau de la joue gauche.

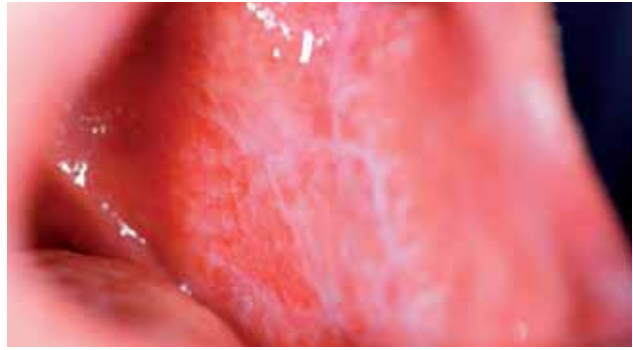


Abb. 3 Indikation für eine Bürstenbiopsie: Farnkrautartige Wickhamstreifung im vorderen und hinteren Wangendrittel linksseitig, diese Streifung ist charakteristisch für einen Lichen planus.

Fig. 3 Indication à la biopsie par brosse: Strie de Wickham en forme de fougère au niveau du tiers antérieur et postérieur de la joue gauche; cette striation est caractéristique du lichen plan.

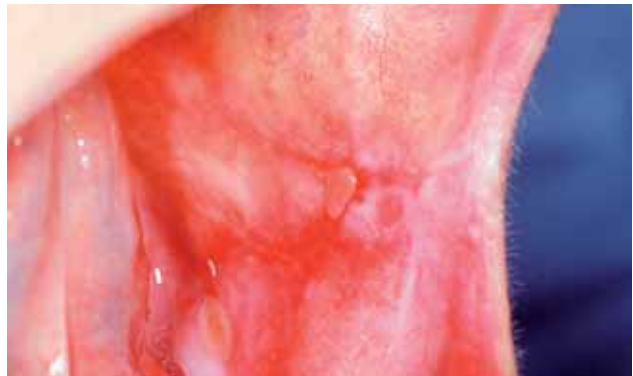


Abb. 4 Indikation für eine Bürstenbiopsie: Die Patientin klagte über dauernde Schmerzen beider Wangen, vor allem beim Genuss saurer oder scharfer Speisen: erosiver Lichen.

Fig. 4 Indication à la biopsie par brosse: cette patiente se plaignait de douleurs persistantes au niveau des deux joues, surtout liée à l'ingestion de mets acides ou épicés: lichen érosif.

gefunden werden, sinkt sie auf nur noch 20%. Das frühzeitige Erkennen oraler Plattenepithelkarzinome stellt die Grundbedingung für eine erfolgreiche Therapie dar und verbessert somit die Überlebenschancen und die Lebensqualität des Patienten. Eine intensive Aufklärung des Patienten über die Ätiologie des Plattenepithelkarzinoms in der (zahn-)ärztlichen Praxis ist von erheblicher Bedeutung. Den grössten Einfluss kann der Zahnarzt durch eine rasche Diagnostik von unklaren Mundschleimhautveränderungen nehmen und somit sowohl die hohe Mortalität als auch die Morbidität des oralen Plattenepithelkarzinoms senken.

Die einfachste (Screening-)Methode der Tumorfrüherkennung ist die visuelle Inspektion einschliesslich Palpation der oralen und angrenzenden Gewebe. Sie lässt sich einfach und schnell ohne apparativen Aufwand in jeder zahnärztlichen Praxis durchführen. Das Verständnis der klinisch normalen Struktur und der Oberflächenbeschaffenheit der verschiedenen Mundschleimhautregionen erleichtert die Frühdiagnose von Mundschleimhauterkrankungen und somit auch des Mundkrebses. Aber auch dem erfahrenen Kliniker fällt es immer wieder im Alltag schwer, solche Veränderungen hinsichtlich ihres biologischen Verhaltens (Dignität) richtig zu interpretieren. Im Gegensatz zu Karies und Parodontalerkrankungen, mit denen der

Zahnarzt täglich konfrontiert ist, wird er während seiner gesamten Berufstätigkeit im Durchschnitt etwa drei bis vier Plattenepithelkarzinome sehen und erkennen müssen. Problematisch sind auch die mannigfaltigen Erscheinungsformen dieser Entität, die dazu führen, dass die meisten Tumoren erst in einem fortgeschrittenen und damit prognostisch ungünstigen Stadium erkannt werden. Noch viel schwieriger wird es, sogenannte Präkanzerosen oder Präneoplasien als solche zu erkennen und die entsprechende Diagnostik und Therapie einzuleiten. Üblicherweise wird in diesen Fällen chirurgische Probeentnahmen vorgenommen und die weitere Therapie vom Ergebnis der histologischen Untersuchung abhängig gemacht. Aber Probeexzisionen sind als Methode für die Früherkennung des oralen Plattenepithelkarzinoms wegen ihrer invasiven Vorgehensweise in der zahnärztlichen Praxis nur bedingt geeignet. Häufig werden Mundschleimhautveränderungen oder Präkanzerosen gar nicht entdeckt, weil sie entweder zu klein sind oder nicht speziell danach gesucht wird. Nach der Deutschen Mundgesundheitsstudie III wiesen 2,3% aller Männer und 0,9% der Frauen Leukoplakien auf (MICHEELIS & HEINRICH, 1999); eine Studie aus den Niederlanden weist sogar eine Prävalenz von 13,4% bei weissen Mundschleimhautveränderungen aus (SCHEPMAN et al. 1996).



Abb. 5 Indikation für eine Bürstenbiopsie: nicht schmerzhaft, mäßig derbe Erosion im Bereich des rechten Alveolarfortsatzes: mikroinvasives Plattenepithelkarzinom.

Fig. 5 Indication à la biopsie par brosse: érosion non douloureuse, moyennement indurée au niveau du bord alvéolaire du maxillaire droit: carcinome épidermoïde micro-invasif.



Abb. 7 Indikation für eine Bürstenbiopsie: Es besteht der dringende Verdacht auf das Vorliegen eines Plattenepithelkarzinoms des linken Mundbodens einer 60-jährigen Patientin.

Fig. 7 Indication à la biopsie par brosse: forte suspicion de carcinome épidermoïde du plancher buccal gauche chez une patiente de 60 ans.



Abb. 6 Indikation für eine Bürstenbiopsie: leicht blutendes, nicht schmerzhaftes Ulkus mit einer peripheren (Erythro-)Leukoplakie im Bereich des vorderen Mundbodens.

Fig. 6 Indication à la biopsie par brosse: ulcération légèrement hémorragique, non douloureuse d'une (érythro-)leucoplasie au niveau du plancher buccal antérieur.



Abb. 8 Keine Indikation für eine Bürstenbiopsie: Das endophytisch wachsende Plattenepithelkarzinom breitete sich im Bereich des rechten Zungenrandes aus und ist klinisch als solches zweifelsfrei erkennbar.

Fig. 8 Pas d'indication à la biopsie par brosse: ce carcinome épidermoïde à croissance endophytique s'étend à partir du bord droit de la langue. Il s'agit à l'évidence d'une tumeur maligne.

Oftmals werden solche vermeintlich harmlosen Veränderungen als nicht «biopsiewürdig» bewertet und eine kurzmaschige Kontrolle für nicht notwendig erachtet. Gerade hier liegt der neue Ansatz einer minimalinvasiven Diagnostik mittels Bürstenabstrich. Bei allen Veränderungen, wie Leukoplakien, Lichen, Erythroplakien und selbstverständlich bei Tumorverdacht, sollten zytologische Präparate gewonnen und vom Pathologen untersucht werden. Die Bürstenbiopsie könnte einen Beitrag dazu leisten, Plattenepithelkarzinome frühzeitig zu erkennen und somit die Sterblichkeit zu senken.

Material und Methode der «Leipziger Bürstenbiopsie»

Seit 1997 wird in der Leipziger Klinik ein interdisziplinär entwickeltes minimalinvasives Verfahren angewendet, das ohne grossen technischen und zeitlichen Aufwand dem niedergelassenen Zahnarzt ermöglicht, eine Dignitätsabklärung von unklaren Mundschleimhautbefunden zu erreichen (Abb. 1–9). Die



Abb. 9 Keine Indikation für eine Bürstenbiopsie: Lippenkarzinome eignen sich nicht für die Bürstenbiopsie, die ausgeprägte Verhornung verhindert eine ausreichende Zellgewinnung.

Fig. 9 Pas d'indication à la biopsie par brosse: les carcinomes des lèvres ne se prêtent pas à la réalisation de biopsies par brosse; la kératinisation importante ne permet pas de recueillir suffisamment de cellules.



Abb. 10 ORCA-Brush Bürstenbiopsie-Set der DGOD Deutsche Gesellschaft für orale Diagnostika (Vertrieb: Heico Dent, Schitterstrasse 11, CH-9413 Obereg).
 Fig. 10 Set pour biopsie par brosse ORCA-Brush de la Deutsche Gesellschaft für orale Diagnostika (DGOD) (Représentation: Heico Dent, Schitterstrasse 11, CH-9413 Obereg).



Abb. 11 Vorbereitung der fünf Objektträger pro Lokalisation: Beschriftung der Objektträger mit dem Namen des Patienten.
 Fig. 11 Préparation de cinq lames porte-objets par localisation: le nom du patient est écrit sur la lame.



Abb. 12 Entnahme der repräsentativen Zellen an der suspekten Schleimhautläsion.
 Fig. 12 Prélèvement par brosse de cellules représentatives au niveau de la lésion muqueuse potentiellement suspecte.

Basis unserer Methode stellt die seit Jahren in der Früherkennung des Zervixkarzinoms etablierte Exfoliativzytologie dar. Das Verfahren wurde entsprechend an die Situation in der Mundhöhle angepasst. Es können oberflächliche abgeschilferte Zellen sowie mittlere und tiefe Zellverbände des Gesamtepithels mittels einer speziellen Bürste gewonnen, auf einen Glasobjektträger übertragen und anschliessend zytopathologisch untersucht werden. Damit stellt die Untersuchung ein minimalinvasives Vorgehen dar (Abb. 10–15). Die Gewinnung repräsentativer Zellen sollte mithilfe eines speziell für die Mundhöhle entwickelten Zellkollektors erfolgen (ORCA-Brush, DGOD, Leipzig). Der Entnahmevergang sollte pro Läsion mindestens vier- bis fünfmal wiederholt werden, damit eine ausreichende Anzahl repräsentativer Epithelzellen zur zytopathologischen Untersuchung gelangen. Andere Systeme sehen nur eine Entnahme vor, was jedoch häufig zu insuffizienten Präparaten führt und daher der hier dargestellten Technik deutlich unterlegen ist (SCHEIFELE et al. 2004; POATE et al. 2004; SLATER, 2004).

Zytologische Diagnostik

Die alkoholfixierten und getrockneten Präparate werden nach Papanicolaou gefärbt und werden anschliessend von einem erfahrenen Zytopathologen untersucht. (Abb. 16). Ein gegliederter zytopathologischer Befund enthält folgende Informationen (nach Beschluss der Arbeitsgemeinschaft für Zytopathologie der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und der Deutschen Gesellschaft für Zytologie [BIBBO et al. 1983; BÖCKING et al. 1984; BÖCKING & FREUDENBERG, 1998]):

1. Angabe des eingesandten Untersuchungsmaterials ggf. auch der klinischen Fragestellung bzw. der klinischen Verdachtsdiagnose laut Begleitschein (z. B. verruköse Leukoplakie mit Dysplasien)
2. Beschreibung des enthaltenen Untersuchungsmaterials: Typ, Makroskopie (Abstrich)
3. Beschreibung der Zellbilder (Kapitel Diagnostische Kriterien) ggf. mit Hinweisen auf Erhaltungszustand und Repräsentativität (z. B. «Candida-Hyphen»).
4. Stufung der Malignitätswahrscheinlichkeit (Diagnostische Kategorien):
 - a. bösartige Zellen nicht nachweisbar (= negativ)
 - b. bösartige Zellen nicht sicher auszuschliessen (= zweifelhaft)
 - c. bösartige Zellen wahrscheinlich (= mit dringendem Verdacht)



Abb. 13 In schwer zugänglichen Bereichen kann die Bürste entsprechend gebogen werden.
 Fig. 13 Dans les régions difficilement accessibles, la brosse peut être recourbée en conséquence.

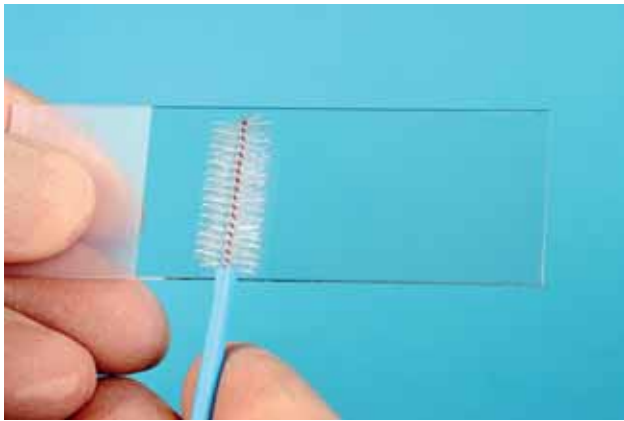


Abb. 14 Übertragung der Zellen von der Bürste auf den Objektträger.

Fig. 14 À partir de la brosse, les cellules sont étalées sur le porte-objet.



Abb. 15 Fixierung der gewonnenen Zellprobe mit einem speziellen Fixiermittel.

Fig. 15 Fixation du matériel cellulaire prélevé avec un fixateur spécial.

- d. bösartige Zellen nachweisbar (= positiv) und unzureichendes Untersuchungsmaterial (mit Begründung z.B. ausgeprägte Lufttrocknungsartefakte).
5. Diagnose im Klartext: Möglichst unter Verwendung der «preferred terms» der ICD-O, deutsche Ausgabe des SNOMED, z.B. das Zellbild entspricht einem Plattenepithelkarzinom (ICD-O 8070/3); ggf. Ausschlussdiagnosen (z.B. kein Anhalt für das Vorliegen einer HPV-Infektion), Kommentare, Empfehlungen, Stellungnahmen zu klinischen Fragestellungen.
- Im Mund können präkanzeröse Dysplasien z.B. in Form von Leukoplakien, Erythro-(Leuko-)Plakien auftreten. Hierbei handelt es sich um histo- bzw. zytologische Veränderungen, die zwar eine Abweichung von der Norm darstellen, aber nicht beweisend sind für Malignität. Eine Unterscheidung einer therapiebedürftige schwere Epitheldysplasie (prospektiv maligne Veränderung) bzw. eines Carcinoma in situ von einer nur kontrollbedürftigen leichten Dysplasie mittels zytologischer Diagnostik ist nicht möglich. Es werden andere Verfahren benötigt. In der gynäkologischen Diagnostik hat sich die DNA-Aneuploidie als sicherer Marker für Neoplasie bewährt. Dieser ermöglicht es, die Diagnose einer schweren Dysplasie (im Sinne einer obligaten Präkanzerose), eines Carcinoma in situ sowie invasiver Plattenepithelkarzinome zu objektivieren.

DNA-Zytometrie

Indikation für eine diagnostische DNA-Bildzytometrie stellt eine Dignitätsabklärung aller Dysplasien mit zweifelhaften oder dringend verdächtigen zytologischen Befund der Plattenepithelien dar (REMMERBACH et al. 2001). Auch anderweitig abnorme Plattenepithelien, deren Dignität nicht sicher beurteilt werden kann, eignen sich zur DNA-zytometrischen Abklärung (ABDEL-SALAM et al. 1988; BJELKENKRANTZ et al. 1983).

Zytopenetik der Plattenepithelkarzinome

Die meisten Tumoren, auch gutartige, zeigen von den übrigen Körperzellen abweichende numerische und/oder strukturelle Chromosomenaberrationen, die nicht in normalen oder reaktiv veränderten Zellen vorkommen (SANDBERG, 1990). In allen bisher untersuchten In-situ- und invasiven oralen Plattenepithelkarzinomen fanden sich derartige chromosomale Aneuploidien. Dem Nachweis chromosomaler Aneuploidie kommt damit die Funktion eines Markers für neoplastische Transformationen der Zelle

zu. Für die Routine-Tumordiagnostik sind zytogenetische Untersuchungen aber zu zeitaufwendig und zu kostenintensiv. Alternativ bietet sich an, den Nettoeffekt der chromosomalen Aberrationen auf den DNA-Gehalt der Zellkerne als diagnostischen Marker zu nutzen. DNA-Aneuploidie ist das quantitative zytometrische Äquivalent chromosomaler Aneuploidie. In Plattenepithelien ist DNA-Aneuploidie nur in malignen Zellen nachgewiesen worden (WRIGHT et al. 1994). Die Nichtnachweisbarkeit von DNA-Aneuploidie schliesst Malignität aber nicht aus, da wenige Tumoren so geringe Aberrationen zeigen, dass sie keinen DNA-zytometrisch nachweisbaren Effekt haben. Diese Befunde stellen die Grundlage für die Hypothese dar, dass diejenigen plattenepithelialen Dysplasien obligate Präkanzerosen darstellen, welche DNA-Aneuploidie aufweisen.

Untersuchungsmaterialien

Zur DNA-Bildzytometrie eignen sich vorgefärbte Ausstriche von Mundschleimhautabstrichen. Eine Verwendung von Gewebeschnitten zur DNA-Messung ist wegen nicht zu kontrollierender schnittbedingter Artefakte für diagnostische Aussagen nicht statthaft (GIROUD et al. 1998).

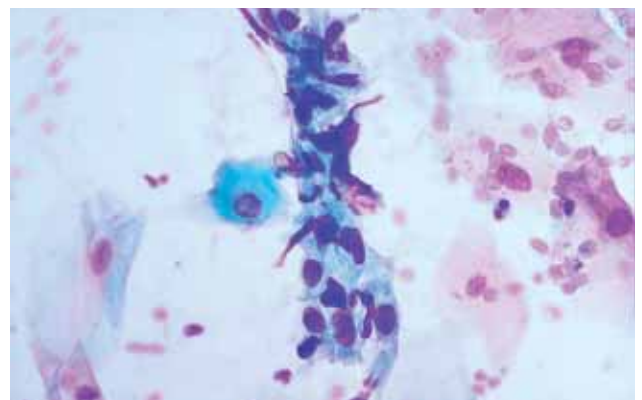


Abb. 16 Das nach Papanicolaou (PAP) gefärbte Ausstrichpräparat zeigt Epithelzellen mit schweren Dysplasien (= schwere intraepitheliale Neoplasie), (63× Objektiv).

Fig. 16 Le frottis coloré selon Papanicolaou (PAP) montre des cellules épithéliales présentant une dysplasie sévère (= néoplasie intra-épithéliale de degré III), (objectif 63×).

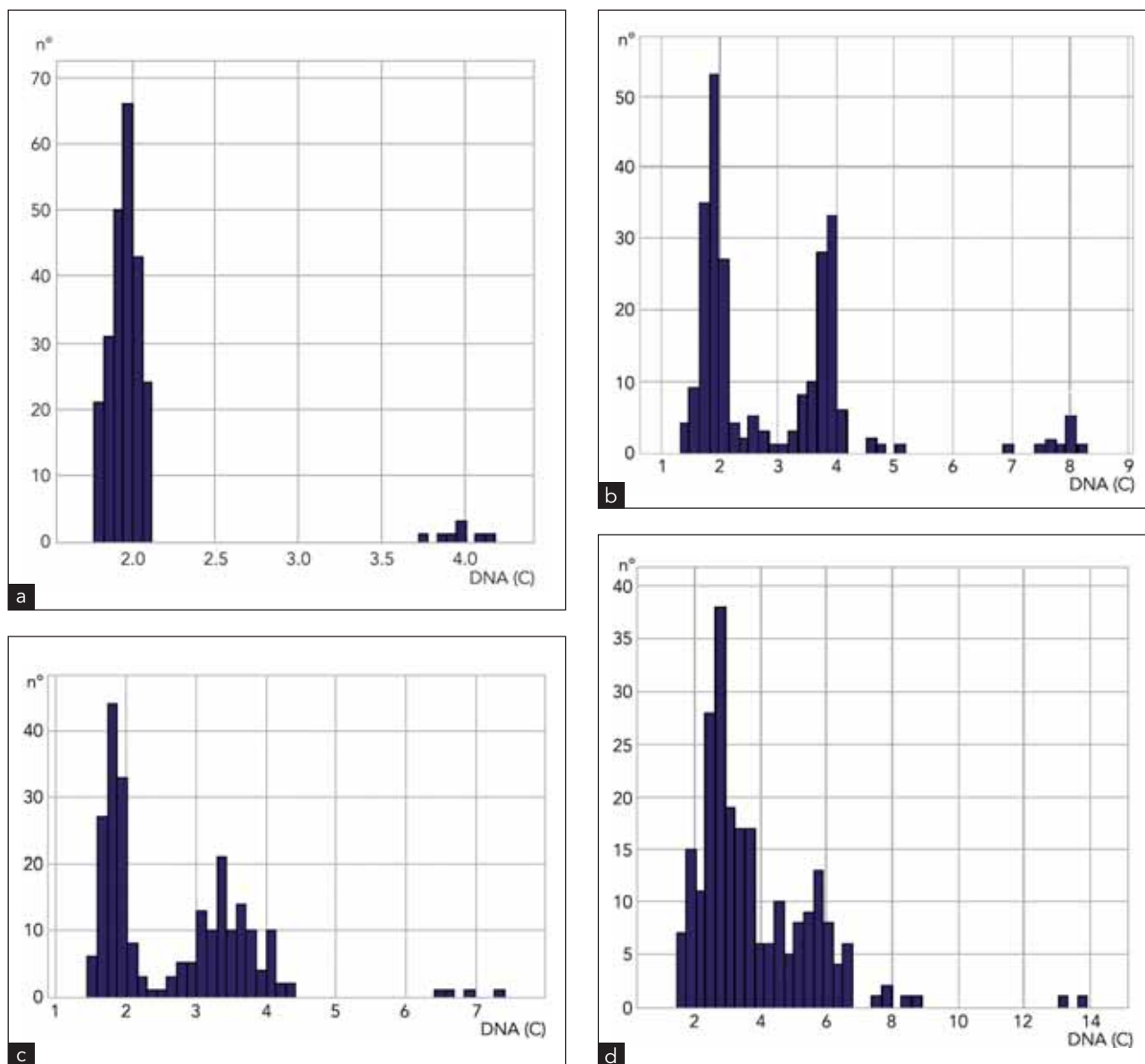


Abb. 17 Beispielhafte DNA-Histogramme von Bürstenbiopsien der diagnostischen Kategorien. a) DNA-euploid (= gutartig): Häufigkeitsgipfel (Stammlinie) bei 2.0c, keine Zellen mit einem DNA-Gehalt grösser 9c. b) DNA-polyloid (= gutartig): Stammlinie bei 2c und 4c sowie einzelne Werte bei 8c. c) DNA-aneuploid (= bösartig): Einzelzellaneuploidie durch zwei Zellen mit einem DNA-Gehalt grösser 9c. d) DNA-aneuploid (= bösartig): Abnorme Häufigkeitsgipfel (Stammlinien) bei 1.7c und 3.4c sowie Zellen mit einem DNA-Gehalt grösser 9c.

Fig. 17 Catégories diagnostiques avec exemples d'histogrammes de l'ADN à partir de biopsies par brosse. a) ADN euploïde (= bénin): pic de fréquence à 2.0c, pas de cellules avec un contenu en ADN supérieur à 9c. b) ADN polyplôïde (= bénin): pics à 2c et 4c, avec quelques valeurs isolées à 8c. c) ADN aneuploïde (= malin): aneuploïdies cellulaires isolées avec deux cellules dont le contenu en ADN est supérieur à 9c. d) ADN aneuploïde (= malin): pics de fréquence anormaux à 1,7c et 3,4c, avec quelques cellules dont le contenu en ADN est supérieur à 9c.

DNA-Färbung

Eine quantitative Färbung der Zellkern-DNA nach FEULGEN und ROSSENBECK (1924) mit Pararosanilin (violett) oder Thionin (blau) ist obligat. Diese sollte mit einem speziellen Färbeautomaten über Nacht erfolgen. Nach Feulgen (um-)gefärbte Präparate können anschliessend zurückgefärbt werden, sodass sie wieder konventionell mikroskopisch beurteilbar sind.

DNA-Messung

Die Messung der integrierten optischen Dichte der Zellkerne erfolgt interaktiv am Monitor eines mit einem konventionellen

Mikroskop gekoppelten, PC-basierten Bildanalysesystems. Das Mikroskop ist mit einer TV-Kamera samt passendem Interferenzfilter ausgestattet. Innerhalb der relevanten atypischen Zellpopulation werden, sofern vorhanden, mindestens 300 Zellkerne nach Zufallskriterien gemessen. Eine Ausnahme bildet das gezielte Suchen nach einzelnen Zellen mit einem pathognomonisch erhöhten DNA-Gehalt grösser als 9c (1c entspricht der DNA-Menge eines einfachen Chromosomensatzes). Die Messung erfolgt automatisch nach Anklicken relevanter Zellkerne mit einer Maus auf dem Monitor. Als Referenzzellen werden zirka 30 im selben Präparat befindliche, morphologisch unauf-

fällige diploide Zellen (zum Beispiel normale Intermediärzellen oder Lymphozyten) gemessen.

Messpräzision

Für die vom Hersteller zu garantierende und vom Nutzer regelmässig zu kontrollierende Präzision des Messsystems sind von der European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP) detaillierte Testmessungen und obligate Richtwerte vorgeschlagen worden, die einzuhalten sind (GIROUD et al. 1998).

Diagnostische Kriterien

Die Befundung der DNA-Histogramme zu diagnostischen Zwecken erfolgt qualitativ in die Kategorien DNA-diploid, DNA-polyploid und DNA-aneuploid, gemäss den in der Grafik illustrierten Kriterien (Abb. 17). Ein polyploides DNA-Histogramm spricht z.B. für das Vorliegen eines Humanen Papillomvirus-Infektes (EVANS & MONAGHAN, 1983). Es kann Anlass für eine weitere Abklärung durch eine HPV-Typisierung sein (SYRJÄNEN et al. 1983; REMMERBACH et al. 2004a).

Ergebnisse

Die routinemässige zytologische Begutachtung von 332 Patienten mit insgesamt 1328 Präparaten gewonnen erzielte eine Sensitivität von 91,3% und eine Spezifität von 95,1%. Der negative Vorhersagewert lag für die konventionelle Zytologie bei 92,3% und der positive Vorhersagewert erreichte 94,4%. Durch die kombinierte Auswertung der Zytologie und der DNA-Bildzytometrie konnte eine Steigerung der diagnostischen Treffsicherheit erreicht werden; die Sensitivität betrug dann 97,8% bei einer Spezifität von 100%. Der positive Vorhersagewert lag bei 100% und der negative Vorhersagewert erreichte 98,1%.

Diskussion

Die Arbeitsgruppe REMMERBACH & BÖCKING hat bereits 1999 erstmalig in Europa ihre Ergebnisse zur Treffsicherheit der Bürstenbiopsie einschliesslich der statischen DNA-Zytometrie vorgestellt. Eine aktuelle Studie unserer Arbeitsgruppe bestätigt die Ergebnisse (REMMERBACH et al. 2004b). Die Arbeitsgruppe um MARAKI et al. (2004) erzielte mit dem gleichen Diagnostiksystem an 98 Patienten in ihrer ebenfalls prospektiv angelegten Studie nach Leipziger Vorbild eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 97,4% einschliesslich DNA-Zytometrie. Wir führen die hohe Treffsicherheit in beiden Studien auf die wiederholte Abstrichentnahme an der identischen Läsion zurück, da man durch dieses Vorgehen die Zahl der repräsentativen Zellen, die zur zytologischen Untersuchung gelangen, deutlich erhöht. Der Nachweis von DNA-Aneuploidie in Dysplasien des Plattenepithels qualifiziert diese als obligat präkanzerös beziehungsweise prospektiv maligne. Eine DNA-aneuploide Dysplasie, gleich welchen Grades, stellt somit eine Indikation zur chirurgischen Entfernung der Veränderung mit histologischer Nachuntersuchung dar. Der DNA-Zytometrie kommt daher sowohl in der gynäkologischen als auch oralen Zytologie nicht nur die Funktion der Dignitätsabklärung von Dysplasien, sondern auch der Qualitätskontrolle tumorzell-positiver Diagnosen zu (NENNING et al. 1997; NENNING et al. 1995; WALSH et al. 1995). Daher empfehlen wir auch bei der zytologischen Begutachtung der oralen Bürstenbiopsien bei allen nicht sicher tumorzell-negativen Befunden die strikte Anwendung der objektivier- und reproduzierbaren DNA-Bildzytometrie. Alternativ kommt auch die Quantifizierung der argyrophilen Nucleolus-organisierenden Regionen (AgNOR-Analyse)

zur Klärung zweifelhafter bzw. zur Bestätigung tumorzell-positiver Befunde in Frage (REMMERBACH et al. 2003b).

Die sogenannte «brush-biopsy» mit dem OralCDx-Gerät der Firma CDx Laboratories (Suffern, NY, USA) basierend auf einer TV-Bildanalyse ist nicht mit der dargestellten DNA-Zytometrie zu verwechseln, es handelt lediglich um einen kostenintensiven Laborautomaten zum Vorsortieren (Screening) von zytologischen Präparaten. Die Beurteilung der Präparate erfolgt nicht direkt am Mikroskop, sondern anhand der vom System herausgesuchten Zellen weiterhin durch einen Pathologen am Bildschirm. Das Verfahren verhilft jedoch nicht zu einer endgültigen Diagnose in Bezug auf die Anwesenheit oder Abwesenheit von Malignität, wie es die hier vorgestellte untersucherunabhängige Methode der DNA-Zytometrie ermöglicht. Ein weiterer Nachteil der OralCDx-Methode ist in der nicht zu vernachlässigenden hohen Zahl von inadäquaten Präparaten zu sehen, die in der Literatur für das OralCDx-Verfahren zwischen 2% und 7% liegen. Häufige Abstrichwiederholungen führen zu einem oftmals vermeidbaren temporären Verzug in der Dignitätsabklärung unklarer Schleimhautveränderungen. Für die hier vorgestellte Leipziger Bürstenbiopsie lag die Quote der insuffizienten zytologischen Präparate unter 0,5%. Weiterhin erschwert die verwendete (im deutschsprachigen Raum unübliche) Nomenklatur der OralCDx-Methode die Vergleichbarkeit mit internationalen Studien: Legt man annähernd vergleichbare Massstäbe zur Berechnung der diagnostischen Treffsicherheiten an (d.h. man wertet nur die «positiven» sowie die «dringend verdächtigen» zytologischen Ergebnisse zu den richtig-positiven und wertet die «atypical epithelial cells» und «zweifelhaften» nicht zu den richtig-positiven Ergebnissen), so erzielte nach einer Studie von SCHEIFELE et al. (2004) das OralCDx-Verfahren eine Sensitivität von 61,5% und eine Spezifität von 97,1%, was damit deutlich unter dem in der bereits zitierten Literaturübersicht von KAUGARS (1998) angegebenen Durchschnitt für die konventionelle orale Zytologie von 87,3% liegt. Das scheint wohl auch der Grund dafür gewesen zu sein, warum sich in Deutschland ein fast baugleiches Gerät in der Zytologie des Gebärmutterhalses nicht etablieren konnte, sondern von allen deutschsprachigen pathologischen Fachgesellschaften abgelehnt wurde.

Dagegen stellt die DNA-Bildzytometrie ein preiswertes adjuvantes, weitestgehend untersucherunabhängiges und prospektives Verfahren zur Verbesserung der Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik dar (REMMERBACH et al. 2003a), das sich zudem mit der histologischen Beurteilung messen und unnötige Probeexzisionen vermeiden kann.

Ausbildung/Fortbildung

Wie bei jeder Anwendung einer neuen Technik muss man sich mit der Bürstenbiopsie vertraut machen. Trotz einfacher Handhabung können für den Ungeübten bei der Entnahme einige Schwierigkeiten in den verschiedenen Regionen der Mundhöhle auftreten. Unter Berücksichtigung der nicht unerheblichen Folgen einer unzureichenden Abstrichentnahme für den Patienten ist die individuelle Schulung der Zahnärzten dringend zu empfehlen. Die DGOD Deutsche Gesellschaft für orale Diagnostik mbH (in Zusammenarbeit mit der Firma HeicoDent www.heicodent.ch) ist bisher der einzige Anbieter, der entsprechende Bürstenkurse mit Workshops für die niedergelassenen Kollegen in der Schweiz anbietet.

Fazit für die Praxis

Nur durch frühzeitiges Erkennen und Abklärung von unklaren Schleimhautveränderungen wird es langfristig möglich sein,

die unakzeptabel hohe Morbidität und Mortalität des oralen Plattenepithelkarzinoms zu senken. Leider kommt es immer wieder im Rahmen der zahnärztlichen Vorfelddiagnostik (REMMERBACH, 2002) zu gravierenden Irrtümern und tragischen Versäumnissen.

Abgesehen von Verschleppungszeiten durch den Patienten selbst, kommt es immer wieder zu Einweisungsverzögerungen durch den Zahnmediziner (PAPE, 1981). Infolge einer fehlenden oder falschen Diagnose werden verzögernde und verschleppende Therapien eingeleitet, die für den Patienten fatale Folgen haben. Gerade in diesen Zweifelsfällen hat sich die Durchführung der Bürstenbiopsie in der täglichen Routine bestens bewährt (REMMERBACH et al. 2001; REMMERBACH et al. 2003a; REMMERBACH et al. 2003b; REMMERBACH et al. 2004b). Jeder niedergelassene Zahnarzt sollte sich die nötigen Erfahrungen in der Gewinnung zytologischen Materials mittels Bürstenbiopsie aneignen und alle Leukoplakien, Lichen, Erythroplakien und bei Tumorverdacht Bürstenabstriche vornehmen. Die Abstrich-technik ist einfach zu erlernen und bedarf nicht per se der Überweisung zum Oral- oder Kieferchirurgen. Der Oralmediziner beweist hier dem Patienten gegenüber Fachkompetenz und schafft durch die Vorsorgeuntersuchung Vertrauen. Der Zahnarzt wird so dazu beizutragen können, den sekundären Zeitverlust der Tumorpatienten bis zur adäquaten Therapie weiter zu minimieren und ihnen vielleicht somit eine höhere Lebensqualität zu sichern.

Abstract

REMMERBACH T W, HEMPRICH A, BÖCKING A: **Minimal invasive Brush Biopsy: Diagnostic aid for earliest detection of oral cancer** (in German). Schweiz Monatsschr Zahnmed 117: 927–935 (2007)

The aim of this prospective and blinded study was to investigate the diagnostic accuracy of conventional cytopathology of oral brush biopsies taken from suspicious oral lesions. In addition we checked slide based DNA image cytometry as an adjuvant diagnostic tool. Our hypothesis is that DNA aneuploidy is a sensitive and specific marker for earliest detection of oral cancer using brush biopsies. Therefore the nuclear DNA contents were measured after Feulgen re-staining using a TV image analysis system. DNA aneuploidy was assumed if abnormal DNA stemlines or cells with DNA content greater $9c$ were observed. Sensitivity of our cytological diagnosis in oral smears for the detection of cancer cells thus was 91.3%, specificity for the detection of non-neoplastic cells was 95.1%, positive predictive value 94.4% and negative predictive value 92.3%. The adjuvant DNA image cytometry reached a sensitivity of 97.8%, the specificity and the positive predictive value were 100% and negative predictive value was 98.1%, respectively.

Smears from oral brush biopsies of all visible oral lesions are an easily practicable, cheap, minimal invasive, painless and safe screening method for detection of oral precancerous lesions and squamous cell carcinomas in all stages. We conclude that DNA image cytometry is a very sensitive and highly specific, objective and reproducible adjuvant tool for identification of neoplastic cells in oral smears.

Literaturverzeichnis

ABDEL-SALAM M, MAYALL B H, CHEW K, SILVERMAN S JR, GREENSPAN J S: Prediction of malignant transformation in oral epithelial lesions by image cytometry. *Cancer* 62: 1981–1987 (1988)

- BIBBO M, ALENGHAT E, BAHR G F, BARTELS P H, DYTCH H E, HERBST A L, KEEBLER C M, PISHOTTA F T, WIED G L: A quality-control procedure on cervical lesions for the comparison of cytology and histology. *J Reprod Med* 28: 811–822 (1983)
- BJELKENKRANTZ K, LUNDGREN J, OLOFSSON J: Single-cell DNA measurement in hyperplastic, dysplastic and carcinomatous laryngeal epithelia, with special reference to the occurrence of hypertetraploid cell nuclei. *Anal Quant Cytol* 5: 184–188 (1983)
- BÖCKING A, ADLER C P, COMMON H H, HILGARTH M, GRANZEN B, AUFFERMANN W: Algorithm for a DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. *Anal Quant Cytol* 6: 1–8 (1984)
- CARVALHO A L, NISHIMOTO I N, CALIFANO J A, KOWALSKI L P: Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer* 114(5): 806–816 (2005)
- EVANS A S, MONAGHAN J M: Nuclear DNA content of normal, neoplastic and "wart-affected" cervical biopsies. *Anal Quant Cytol* 5: 112–116 (1987)
- GILLILAND F D, HUNT W C, MORRIS D M, KEY C R: Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973–1991. *Cancer* 79: 564–565 (1997)
- GIROUD F, HAROSKE G, REITH A, BÖCKING A: 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II: Specific recommendations for quality assurance. *European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol* 17: 201–208 (1998)
- KAUGARS G E, SILVERMAN S JR, RAY A K, PAGE D G, ABBEY L M, BURNS J C, SVIRSKY J A: The use of exfoliative cytology for the early diagnosis of oral cancers: is there a role for it in education and private practice? *J Cancer Educ* 13: 85–89 (1998)
- MARAKI D, BECKER J, BÖCKING A: Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. *J Oral Pathol Med* 33: 398–404 (2004)
- MICHEELIS W, HEINRICH R: Dritte deutsche Mundgesundheitsstudie – DMS III: Ergebnisse, Trends und Problemanalysen auf der Grundlage bevölkerungsrepräsentativer Stichproben in Deutschland 1997. Dt. Ärzte-Verlag (1999)
- NENNING H, HERING B, HORN L C, KUHNDEL K: Prognostischer Wert der DNA-Zytometrie bei Zervixzytologien PAP IIIID. *Ver Dtsch Ges Path* 81: 651 (1997)
- NENNING H, HORN L C, KUHNDEL K, BILEK K: False positive cervical smears: a cytometric and histological study. *Anal Cell Pathol* 9: 61–68 (1995)
- PAPE H D: Grösse der malignen Mundschleimhauttumoren zum Zeitpunkt der Primärdiagnostik. *Dtsch Zahnärztl Z* 36: 689 (1981)
- POATE T W, BUCHANAN J A, HODGSON T A, SPEIGHT P M, BARRETT A W, MOLES D R, SCULLY C, PORTER S R: An audit of the efficacy of the oral brush biopsy technique in a specialist Oral Medicine unit. *Oral Oncol* 40: 829–834 (2004)
- REMMERBACH T W: Die Früherkennung des Mundkrebses – eine Herausforderung für den Zahnarzt. *Thüringisches Zahnärzteblatt* 9: 25–30 (2002)
- REMMERBACH T W, BRINCKMANN U G, HEMPRICH A, CHEKOL M, KUHNDEL K, LIEBERT U G: PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol* 30: 302–308 (2004a)
- REMMERBACH T W, MATHES S N, WEIDENBACH H, HEMPRICH A, BÖCKING A: Noninvasive brush biopsy as an innovative tool for early detection of oral carcinomas. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8: 229–236 (2004b)

- REMMERBACH T W, WEIDENBACH H, HEMPRICH A, BÖCKING A: Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: report on four cases. *Anal Cell Pathol* 25: 159–166 (2003a)
- REMMERBACH T W, WEIDENBACH H, MÜLLER HEMPRICH A, POMJANSKI N, BUCKSTEGGE B, BÖCKING A: Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Anal Cell Pathol* 25: 139–146 (2003b)
- REMMERBACH T W, WEIDENBACH H, POMJANSKI N, KNOPS K, MATHES S, HEMPRICH A, BÖCKING A: Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal Cell Pathol* 22: 211–221 (2001)
- SANDBERG A: "The chromosomes in human cancer and leukemia." Elsevier, New York, Amsterdam, Oxford (1990)
- SCHEIFELE C, SCHMIDT-WESTHAUSEN A M, DIETRICH T, REICHART P A: The sensitivity and specificity of the OralCDx technique: evaluation of 103 cases. *Oral Oncol* 40: 824–828 (2004)
- SCHEPMAN K P, VAN DER MEIJ E H, SMEELE L E, VAN D WAAL I: Prevalence study of oral white lesions with special reference to a new definition of oral leucoplakia. *Eur J Cancer* 32: 416–419 (1996)
- SLATER L J: Oral brush biopsy: false positives redux. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97: 419 (2004)
- STELL P M, WOOD G D, SCOTT M H: Early oral cancer: treatment by biopsy excision. *Br J Oral Surg* 20: 234–238 (1982)
- SYRJÄNEN K, SYRJÄNEN S, LAMBERG M, PYRHONEN S, NUUTINEN J: Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 12: 418–424 (1983)
- WALSH C B, THORNHILL M, KAY E, WHELAN D, BARRY D, TURNER M, PRENDIVILLE W, LEADER M: DNA quantification is technically feasible and of value in cervical smear samples: possible applications for determination of progression in low grade dyskaryosis *Cytopathology* 6: 88–94 (1995)
- WRIGHT T C, KURMANN R G, FERENCZY A: Precancerous lesions of the uterine cervix. In R. Kurmann (Eds.) *Blaustein's pathology of the female genital tract*. Springer Verlag, New York, pp. 229–277 (1994)