

Molekulare Feinnadelaspirationszytologie (FNAZ) Diagnostik für die Diagnostik des Schilddrüsenknotens.

¹Dr. rer. nat. Markus Eszlinger, ²Dr. med. Ilka Ruschenburg, ¹Prof. Dr. med. Ralf Paschke

¹ Klinik für Endokrinologie und Nephrologie, Universität Leipzig

² MVZ wagnerstibbe für Gynäkologie, Reproduktionsmedizin, Zytologie, Pathologie und Innere Medizin GmbH, Grimsehlstraße 8a, 37574 Einbeck

Bedeutung der Feinnadelaspirationszytologie (FNAZ)

Nach der Risikostratifizierung durch Anamnese, Calcitoninbestimmung und Schilddrüsenultraschall zur Erfassung von sonographischen Malignitätsindikatoren ist die Feinnadelaspirationszytologie (FNAZ) des Schilddrüsenknotens die Methode mit der höchsten Sensitivität (83%) und Spezifität (92%) zur Unterscheidung benigner und maligner Schilddrüsenknoten [1-4].

Unter optimalen Bedingungen führt die präoperative FNAZ in 60 – 80 % zu zytologisch benignen, in 2 – 5 % zu malignen Ergebnissen und in 10 – 15 % zu nicht diagnostischen Ergebnissen [2, 4]. 10 – 20 % der FNAZ werden als follikuläre Neoplasie / follikuläre Proliferation (indeterminierbar) klassifiziert. In diesem Fall kann mit dem zytologischen Material nicht zwischen dem benignen Schilddrüsenadenom oder adenomatösen Knoten und dem follikulären Schilddrüsenkarzinom unterschieden werden, da die Malignitätskriterien der Kapsel- oder Angioinvasion zytologisch nicht fassbar sind. Daher müssen Patienten mit dieser zytologischen Diagnose in der Regel operiert werden. Dies führt in ca. 20 % zu malignen und in ca. 80 % zu benignen Befunden, bzw. letztendlich „diagnostischen“, d.h. unnötigen Schilddrüsenoperationen [2, 4].

Möglichkeiten der molekularen FNAZ

Für die Klassifizierung und auch für die FNAZ-Diagnostik von Schilddrüsentumoren haben sich mit der Entdeckung von somatischen Mutationen bei 42 % der PTC und 65 % der FTC neue Perspektiven ergeben [5, 6] (**Abb 1**). Der Nachweis der verschiedenen somatischen Mutationen in FNAZ Material kann nach mehreren Studien zu einer weiteren diagnostischen Entscheidung für einen Teil der als follikuläre Proliferation/Neoplasie (indeterminierbar) klassifizierten FNAZ (und anderer FNAZ Ergebnisse, **Tab 1**) führen. Bisher haben 16 Studien eine somatische Mutation wie z. B. BRAF oder RET/PTC Rearrangements untersucht [6] und 4 Studien haben mehrere Mutationen (BRAF, RAS, RET/PTC und PAX8/PPARG) [6] untersucht.

Alle 4 Studien mit dem Nachweis mehrerer Mutationen und alle Studien, welche RET/PTC oder PAX8/PPARG Rearrangements untersucht haben, haben frisches (meist zusätzlich gewonnenes) FNAZ Material, welches bei -80 Grad aufbewahrt wurde, untersucht. FNAZ Material von routinemäßig angefertigten luftgetrockneten FNAZ Ausstrichen wurde bisher nur in 5 Studien untersucht, welche alle nur BRAF Mutationen nach Extraktion von DNA nachgewiesen haben [6]. Die Verwendung der routinemäßig für die molekulare FNAZ Diagnostik angefertigten luftgetrockneten FNAZ Ausstriche hat wichtige Vorteile gegenüber der Analyse von frischem (meist zusätzlich gewonnenem) FNAZ Material wie:

1. Verwendung des gleichen luftgetrockneten Routine-Ausstrichs, welcher durch den Zytopathologen beurteilt wurde für die molekulare Analyse. Daher können evtl. unterschiedliche Beurteilungen nicht durch unterschiedliche Proben bedingt sein.

2. Es besteht keine Notwendigkeit für eine zweite FNAZ für die molekulare Diagnostik und daher weniger Belastung für den Patienten.
3. Die molekulare Diagnostik wird nur bei zytologischen Befunden unklarer Dignität eingesetzt.
4. Es ist nicht erforderlich, einen Teil des frischen Punktionsmaterials oder weiteres FNAZ Material speziell für die mRNA Extraktion vorzubereiten.
5. Es ist nicht erforderlich, einen Teil des zytologischen Materials oder weiteres zytologisches Material bei -80 Grad aufzubewahren bis die zytologische Diagnostik abgeschlossen ist um danach nur ca. 20 % der -80 Grad Proben für die molekulare Analyse auszuwählen.
6. Es entstehen geringere Kosten durch Wegfall unnötiger paralleler zytologischer und molekularer Diagnostik.

Ergebnisse der molekularen FNAZ Untersuchung von luftgetrockneten Routine Ausstrichen

Der erstmalige erfolgreiche RNA basierte Nachweis von RET/PTC und PAX8/PPARG Rearrangements in luftgetrockneten Routine FNAZ Ausstrichen war die Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung der molekularen FNAZ Analyse von luftgetrockneten Routine FNAZ Ausstrichen mittels mehrerer Mutationen (BRAF, NRAS, HRAS, KRAS, RET/PTC und PAX8/PPARG) [7]. Nachfolgend konnte an 310 Routine FNAZ Ausstrichen die Zuverlässigkeit der molekularen FNAZ Analyse luftgetrockneter Routine FNAZ Ausstriche mittels BRAF, NRAS, HRAS, KRAS, RET/PTC und PAX8/PPARG Mutationsanalyse gezeigt werden [8]. Für bis zu 10 Jahre alte Routine-Zytologiepräparate mit der Beurteilung follikuläre Proliferation/Neoplasie /indeterminierbar konnte mit zusätzlich zur zytologischen Beurteilung eingesetztem molekularem Screening eine Sensitivität von 75 % erreicht werden [8]. Diese Ergebnisse liegen im Bereich der Sensitivität zwischen 38 - 86 % der bisherigen vier Studien zur molekularen FNAZ Analyse der gleichen Mutationen für Zytologiepräparate mit der Beurteilung follikuläre Neoplasie/follikuläre Proliferation/indeterminierbar, für welche (überwiegend zusätzlich gewonnenes) frisches FNAZ Material verwendet wurde, das bei -80 Grad aufbewahrt wurde [8]. Dies gilt insbesondere für die Unterscheidung zwischen benignen Adenomen und follikulären Karzinomen, dem wichtigsten differentialdiagnostischen Thema, welches gleichwohl in zwei der bisherigen Studien mit frischem FNAZ Material nicht untersucht wurde. Die Spezifität aller o.g. Untersuchungen lag bei 98 – 100 %.

Während die material- und methodenbedingte diagnostische Ausfallrate für die bis zu 17 Jahre alten luftgetrockneten Routine Ausstriche für Punktmutationen bei 0,4 und Rearrangements bei 7,1 % lag [8], konnte RET/PTC alleine oder RET/PTC und PAX8/PPARG in beiden bisherigen Studien mit Verwendung von frischem (zusätzlichem) FNAZ Material, welches bei -80 Grad aufbewahrt wurde in 51 und 8 % nicht mittels PCR amplifiziert werden [9, 10].

Bei der Analyse der ersten 130 konsekutiven aktuellen luftgetrockneten FNA Routineausstrichen traten jedoch materialbedingte RT-PCR Ausfälle (für die RET/PTC und PAX8/PPARG Mutationsanalyse) nur in 3 % und nur 1 Ausfall für die DNA Diagnostik auf [11].

Eine Kosteneffektivitätsanalyse der BRAF, NRAS, HRAS, KRAS, RET/PTC und PAX8/PPARG Diagnostik für follikuläre Proliferation/Neoplasie (indeterminierbare Zytologieergebnisse) ergab dass diagnostische Lobektomien um 20 % reduziert werden, die Anzahl der primär totalen Thyreoidektomien sowie die richtig positiven Diagnosen ansteigen, während die falsch positiven zytologischen Diagnosen abnehmen. Weiterhin führte die molekulare FNA Diagnostik insbesondere durch die Reduzierung unnötiger Operationen zu einer Kosteneinsparung [12].

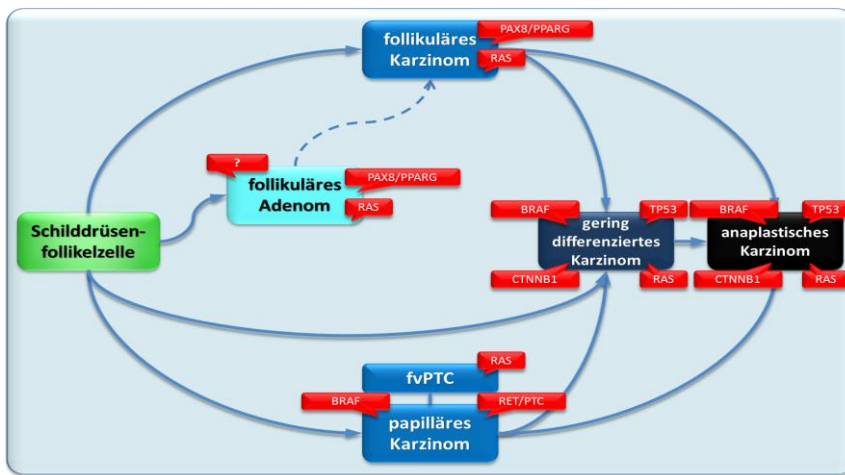


Abb. 1:

Derzeitige Kenntnisse zur molekularen Ätiologie von Schilddrüsenknoten und Schilddrüsenkarzinomen nach Eszlinger und Paschke [13].

Tab. 1:

Möglicher diagnostischer Zugewinn durch molekulare Diagnostik bei follikulärer Proliferation/Neoplasie (indeterminierten) und weiteren Schilddrüsenzytologiediagnosen. TT = Totale Thyreoidektomie

1. *Paschke R, Schmid KW, Gartner R et al.*
Epidemiology, pathophysiology, guideline-adjusted diagnostics, and treatment of thyroid nodules. *Med Klin (Munich)* 2010; 105: 80-87
2. *Gharib H, Papini E, Paschke R et al.*
American Association of Clinical Endocrinologists, Associazione Medici Endocrinologi, and European Thyroid Association medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules. *J Endocrinol Invest* 2010; 33: 1-50
3. *Paschke R*
Drowning in a sea of thyroid nodules? Prevention and selection which nodules should undergo fine needle aspiration biopsy. *MMW Fortschr Med* 2010; 152: 41-44
4. *Paschke R, Hegedus L, Alexander E et al.*
Thyroid nodule guidelines: agreement, disagreement and need for future research. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7: 354-361
5. *Eszlinger M, Krohn K, Hauptmann S et al.*
Perspectives for improved and more accurate classification of thyroid epithelial tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 3286-3294
6. *Ferraz C, Eszlinger M, Paschke R*
Current state and future perspective of molecular diagnosis of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 2016-2026
7. *Ferraz C, Rehfeld C, Krogdahl A et al.*
Detection of PAX8/PPARG and RET/PTC rearrangements is feasible in routine air-dried fine needle aspiration smears. *Thyroid* 2012; 22: 1025-1030
8. *Eszlinger M, Münz S, Ferraz C et al.*
Diagnostic impact of the detection of point mutations and rearrangements in 320 routine air dried fine needle aspiration (FNA) smears. *Eur Thyroid J* 2012; 1[suppl 1] : 101
9. *Cantara S, Capezzone M, Marchisotta S et al.*
Impact of proto-oncogene mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of cytology. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 1365-1369
10. *Nikiforov YE, Otori NP, Hodak SP et al.*
Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically

indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples.
J Clin Endocrinol Metab 2011; 96: 3390-3397

11. *Eszlinger M, Neustadt M, Ruschenburg I, Neumann A, Glaubitz R, Paschke R*
Results of mutation and rearrangements detection in air-dried FNA smears in a routine diagnostic setting of patients with nodular thyroid disease.
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Düsseldorf 2013
12. *Yip L, Farris C, Kabaker AS et al.*
Cost impact of molecular testing for indeterminate thyroid nodule fine-needle aspiration biopsies.
J Clin Endocrinol Metab 2012; 97: 1905-1912
13. *Eszlinger M, Paschke R*
Molecular fine-needle aspiration biopsy diagnosis of thyroid nodules by tumor specific mutations and gene expression patterns.
Mol. Cell. Endocrinology 2010; 322: 29 - 37