

Basisprincipes en gebruik van cytologie in de praktijk

^{1,2}S. Maes, ¹K. Chiers, ²R. van der Luer, ¹R. Ducatelle

¹Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Merelbeke

²Valuepath, Praktijk Veterinaire Pathologie, Hoensbroek, Nederland

sofiemj.maes@ugent.be

SAMENVATTING

Cytologie is een eenvoudige, niet-invasieve, goedkope techniek voor diagnosestelling die in de diergeneeskunde meer en meer ingeburgerd geraakt. In dit overzichtsartikel worden de techniek van staalname en het maken en kleuren van preparaten aangehaald. Ook de huidige toepassingen bij verschillende diersoorten komen aan bod. Daarna worden de basisprincipes van het aflezen van preparaten besproken en geïllustreerd met afbeeldingen.

INLEIDING

Diagnostische cytologie is een techniek die voor het eerst werd beschreven in de negentiende eeuw, maar pas recentelijk meer belangstelling kreeg in de diergeneeskunde. De voordelen zijn vooral de snelheid, prijs en de eenvoud van de techniek. Het morfologisch detail van cellen en vooral van bepaalde infectieuze agentia is veelal duidelijker dan bij histologie. Bovendien is cytologie weinig invasief en is er dus meestal geen anesthesie of sedatie vereist voor de staalname.

De voornaamste beperking van cytologie ten opzichte van histologie is de minimale staalname: een zeer beperkte hoeveelheid cellen wordt beoordeeld in vergelijking tot het gehele proces. Hierdoor kan er geen of maar weinig informatie worden verkregen met betrekking tot de architectuur en een definitieve morfologische diagnose maken is dikwijls niet mogelijk. Een belangrijk punt om dan ook altijd in gedachten te houden is dat, door deze minimale staalname, het staal mogelijk niet representatief is voor het eigenlijke proces (bijvoorbeeld een tumor met chronische ontstekingsreactie, waarbij de oogst slechts uit ontstekingscellen kan bestaan). Daarom is het belangrijk om het cytologieresultaat altijd te interpreteren in het kader van de volledige klinische context. Een ander nadeel is dat de celopbrengst en dus de mogelijkheid voor een cytologische diagnose, sterk afhankelijk zijn van het type weefsel. De gradering van tumorale processen is niet mogelijk met cytologie. Cytologie is dus geen goedkope vervanging van histologisch onderzoek, maar wel nuttig om snel een idee te krijgen van de aard van een bepaald weefsel en om een indicatie te geven voor eventueel verder te ondernemen stappen in de behandeling van de patiënt.

Hieronder volgt een uiteenzetting van de behoeften, de staalname en de techniek van het maken van preparaten. Daarna worden de belangrijkste cytologische kleuringen in de diergeneeskunde kort aan-

gehaald en de basisprincipes voor het aflezen van preparaten besproken.

TECHNIEK

Hoewel redelijk eenvoudig, is het nemen van kwalitatief goede stalen van primair belang voor de uiteindelijke cytologische diagnose! Zonder goede preparaten is het onmogelijk voor de cytoloog om een betrouwbare diagnose of interpretatie te maken.

De basisbenodigdheden zijn glaasjes, naalden en een spuit. Stalen kunnen gekleurd en beoordeeld worden door de dierenarts zelf of ze kunnen ongekleurd worden opgestuurd naar een pathologisch labo. Zelfs indien de stalen ongekleurd worden opgestuurd, is het aangeraden dat de dierenarts zelf een screening uitvoert en nagaat of er voldoende materiaal aanwezig is op de glaasjes en of er niet enkel bloed aanwezig is. Het uitsluiten van deze niet-diagnostische stalen bespaart zowel kosten als tijd.

Als algemene richtlijn bij de staalname is het aan raden stalen te nemen op verschillende plaatsen in een proces (bijvoorbeeld grote massa met centrale necrose: stalen van het centrum zijn niet-diagnostisch, in stalen van de periferie zijn de cellen wel nog intact).

Indien de stalen worden doorgestuurd naar een labo, is een uitgebreide anamnese van belang omdat, zoals reeds vermeld, cytologie altijd moet worden geïnterpreteerd in het kader van het volledige klinische beeld. Vaak is het niet mogelijk om tot een definitieve diagnose te komen met cytologie, maar wel om een antwoord te geven op een concrete vraag waar de clinicus belang aan hecht (bijvoorbeeld tumor of ontsteking).

Staalname

Dunnenaaldtechniek

De meest courant gebruikte afnametechniek is de dunnenaaldtechniek. Hierbij wordt het te onderzoeken

proces op meerdere plaatsen aangeprikt met een naald, al dan niet gevolgd door aspiratie: respectievelijk dunnaaldaspiratiebiopt (DNAB) of dunnaaldbiopt (DNB).

De naald wordt onder een hoek in het proces gebracht en daarna wordt in meer of mindere mate een vacuüm gecreëerd of men maakt zonder vacuüm gebruik van de capillaire werking. De naald wordt in het proces voorzichtig heen en weer bewogen. Hierbij wordt er materiaal geoogst dat zich in de naald en mogelijk, in geringe mate, in de spuit bevindt. Bij bloedrijke weefsels, zoals lever en milt, en weefsels rijk aan cellen in los verband en zonder veel stroma, zoals een lymfeknoop, is de capillaire werking van de naald meestal voldoende en is aspiratie niet nodig. Bij vaste weefsels, zoals sommige mesenchymale tumoren, komen de cellen moeilijk los en is wel meer negatieve druk nodig om cellen te oogsten. Gedurende de aspiratie moet men de naald blijven bewegen. Aspiratie kan de cellen beschadigen en zo artefacten veroorzaken. Bij overmatig vacuüm treden bloedcontaminatie en celbeschadiging gemakkelijker op. Bloedcontaminatie kan ook veroorzaakt worden door een te grote naald, door het niet bewegen van de naald gedurende aspiratie of eenvoudigweg door de aard van het weefsel. Zo zijn schildklier carcinoomen en hemangiosarcomen altijd zeer bloederig, ongeacht de afnametechniek.

Afdrukjes en 'tissue scrapings'

Andere, minder gebruikte afnametechnieken voor vaste weefsels zijn afdrukjes en 'tissue scrapings'. Bij de laatste wordt met een scalpel een klein stukje materiaal afgeschraapt en dit wordt dan op een glaasje uitgestreken. Deze techniek wordt gebruikt wanneer cellen niet exfoliëren bij de andere methoden. Afdrukjes en 'tissue scrapings' kunnen worden gemaakt van excisiebiopten om een snelle indruk te krijgen van de aard van het weefsel. Dit wordt geregeld gedaan voor operatiestukken. In de dermatologie worden afdrukpreparaten gebruikt voor het aantonen van gisten, acantholytische cellen, ontstekingscellen en bacteriën. Soms worden ze gebruikt voor geïncubeerde oppervlakten. Dit wordt niet aangeraden omdat men enkel een beeld krijgt van het oppervlak van het proces (met andere woorden van de ontsteking) en niet van de dieper gelegen regio.

Swabs

Swabs worden specifiek gebruikt voor vaginale, nasale, orale en otische cytologie en zijn nuttig voor alle moeilijk te bereiken lokaties, zoals de neus. Voor gebruik moet de swab in fysiologische oplossing bevochtigd worden en moet de swab na staalname enkele keren onder lichte druk op het glaasje uitgerold worden.

Vloeistoffen

Vloeistoffen worden het beste opgevangen in ethy-

leendiaminetetra-azijnzuur (EDTA) om de vorming van klonters te voorkomen. Omdat de cellen na staalname meestal snel vervallen, is het aangewezen direct uitstrijkjes te maken, zowel vóór als na sedimentatie (zie infra - het concentreren van cellen). Vloeistoffen opsturen naar het labo is niet aangeraden.

Maken van uitstrijkjes

Voordat de naald uit het proces wordt teruggetrokken, wordt eerst de eventuele negatieve druk in de spuit opgeheven. De naald wordt van de spuit gehaald en vervolgens wordt de daarna met lucht gevulde spuit weer op de naald (met inhoud) gezet. De verkregen oogst aanwezig in de naald wordt vervolgens voorzichtig, zonder veel druk, op een preparaatglaasje met matrand gebracht. Bij voorkeur worden meer dan één preparaat van verschillende aspiraties gemaakt. Om te oogsten gebruikt men het beste verschillende oogstechnieken om zodoende de kans op representatieve uitstrijkjes te verhogen.

Het doel van het maken van uitstrijkjes is, ongeacht de techniek, een *monolayer* van cellen te verkrijgen, waarbij de celbeschadiging minimaal is. Veel gebruikt is de techniek waarbij met de rand van een tweede glaasje over een hoek van 45 graden, het vloeibare of dik vloeibare materiaal naar de andere rand voorzichtig wordt uitgestreken. Hierbij wordt aan het einde een v-vormige punt, de zogenaamde 'feathered edge' gevormd. Indien de celoogst klein is, kan men de cellen meestal vinden aan deze 'feathered edge'. Bij het uitstrijken tot aan of over de rand van het glaasje gaan de cellen verloren ("over the edge"). Een andere techniek is deze waarbij de druppel of het brokje staal op een draagglas wordt gelegd. Een tweede draagglas wordt hier opgelegd en zeer voorzichtig aangedrukt. De draagglasjes zitten door de capillariteit enigszins vast aaneen. Het is ten stelligste af te raden om ze los te trekken. Er wordt voorgesteld om ze voorzichtig vaneen te schuiven. Dit geeft gegarandeerd twee dunne en perfect bruikbare uitstrijkjes met een minimum aan mechanische artefacten.

Aspiraten met een hogere viscositeit, zoals zeer visceuze vloeistoffen en aspiraten van vaste weefsels, vereisen meer kracht bij het uitstrijken. Het nadeel hiervan is dat er meer celbeschadiging optreedt. Dit is echter onvermijdelijk. Bij beide methoden is het van belang om zo weinig mogelijk druk op de glaasjes en dus op de cellen uit te oefenen.

Om optimaal celdetail en adhesie van de cellen aan het glaasje te garanderen, moet het materiaal na het uitstrijken direct gedroogd worden. Dit kan door het preparaat in de lucht heen en weer te zwaaien of eventueel door het voorzichtig gebruik van een haardroger (lauwarme lucht) of door gewoonweg het preparaat op de radiator van de centrale verwarming te leggen. Zeer hete lucht van bijvoorbeeld een haardroger en zeker van een bunsenbrander voor het drogen of fixeren is ten zeerste afgeraden.

Niet-uitgesmeerde aspiraten vormen een dikke amorfe massa op het glaasje en kunnen niet geïnter-

preteerd worden. De kunst is dus door het uitsmeren de cellen genoeg te spreiden en tegelijkertijd zo weinig mogelijk celschade te veroorzaken. Het is van belang dat men zich realiseert dat cellen, en met name maligne tumorcellen, zeer fragiel zijn (omdat ze een zwak ontwikkeld cytoskelet hebben) en dat het maken van goede uitstrijkjes dus enige oefening vereist.

Concentreren van cellen

Na de afname van vloeistoffen kan de cellulariteit verhoogd worden door de vloeistof even te laten staan (het beste in de koelkast) of door middel van gewone centrifugatie, cytocentrifugatie of het maken van een 'buffy coat' uitstrijkje. Het nadeel hiervan is dat er aanzienlijke celbeschadiging optreedt, voornamelijk bij centrifugatie en in mindere mate bij cytocentrifugatie. Cytocentrifugatie vereist evenwel gespecialiseerde apparatuur. Bij de 'buffy coat' techniek wordt een buisje voor de hematocrietmeting geprepareerd en gebroken op de overgang tussen het plasmagedeelte en het cellulair concentraat. Dit is nuttig bij bloederige aspiraten en bij onderzoek van bloed naar tumorcellen (Meyer *et al.*, 2010).

Een methode van celconcentratie die snel en praktisch is, is de onderbreking van de uitstrijkbeweging op een bepaalde plaats om dan vervolgens iets verder de rest uit te strijken. Ook kan men het teveel aan vloeistof ruim voor het einde van het glaasje een stukje laten terugvloeien. In de onderbrekingen of in het laatste teruggevloeide deel vindt een concentratie van cellen plaats. Ook hier geldt weer: pas in geval van twijfel verschillende technieken toe en verhoog zo de kans op diagnostisch bruikbare beelden.

KLEURINGEN

De meest gebruikte kleuringen in de diergeneeskunde zijn romanowsky typekleuringen, dit wil zeggen Wright's en maygrünwald giemsakleuringen (commerciële namen zijn onder andere Diff Quick, Hemacolor). De basis is alcohol, vet wordt dus opgelost. Er is beschreven dat sommige van deze kleuringen granules (en in het bijzonder mastcelgranules) slecht aankleuren (Leclere *et al.*, 2006; Allison en Velguth, 2010). Naar de ervaring van de auteurs kleuren de granules van mastcellen goed met bijvoorbeeld Hemacolor, behalve wanneer de kleurbaden te oud of gecontamineerd zijn.

Indien de preparaten worden opgestuurd naar een extern labo is het het beste dit ongekleurd te doen zodat de cytoloog de kleuring kan gebruiken die hij/zij gewoon is. Indien men niet zeker is van de hoeveelheid materiaal of de kwaliteit ervan, is het het beste om al één preparaat zelf te kleuren om zo onnodige kosten te besparen. Het kleuren gebeurt volgens de gebruiksaanwijzing van de specifieke kleuring. De kleurtijd kan enigszins aangepast worden naargelang de concentratie van het uitstrijkje: hoe hoger de celconcentratie, hoe meer tijd nodig om de cellen voldoende te kleuren (Meinkoth *et al.*, 2008).

Papanicolaoukleuringen worden routinematig gebruikt in de humane geneeskunde voor het opsporen van baarmoederhalskanker. In de diergeneeskunde worden ze zelden gebruikt.

Indien nodig kunnen ook bijkomende kleuringen worden gemaakt, zoals gram- (bacteriën) en PAS- (schimmels, gisten en mucines) kleuringen. Gemodificeerde zuurvaste kleuringen, zoals fitekleuring, worden ook regelmatig gebruikt. Deze histochemische kleuringen zijn meestal achteraf gemakkelijk te maken door het oorspronkelijke preparaat te ontkleuren en daarna de procedure voor de gewenste kleuring op te starten.

Voor de differentiatie van bijvoorbeeld lymfomen kan immunocytochemie gebeuren op cytologische preparaten. Immunocytochemie is niet in alle gevallen uitvoerbaar. Hoewel ze in principe ook overheen de basiskleuring mogelijk zijn, geeft dit meestal weinig betrouwbare resultaten en is het aangeraden ongekleurde glaasjes te gebruiken.

INDICATIES

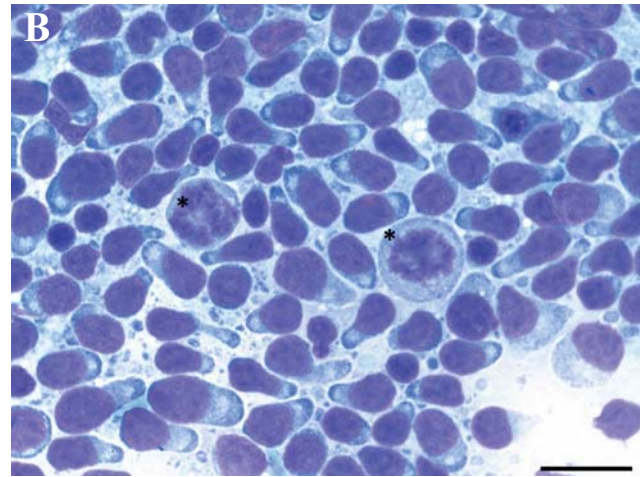
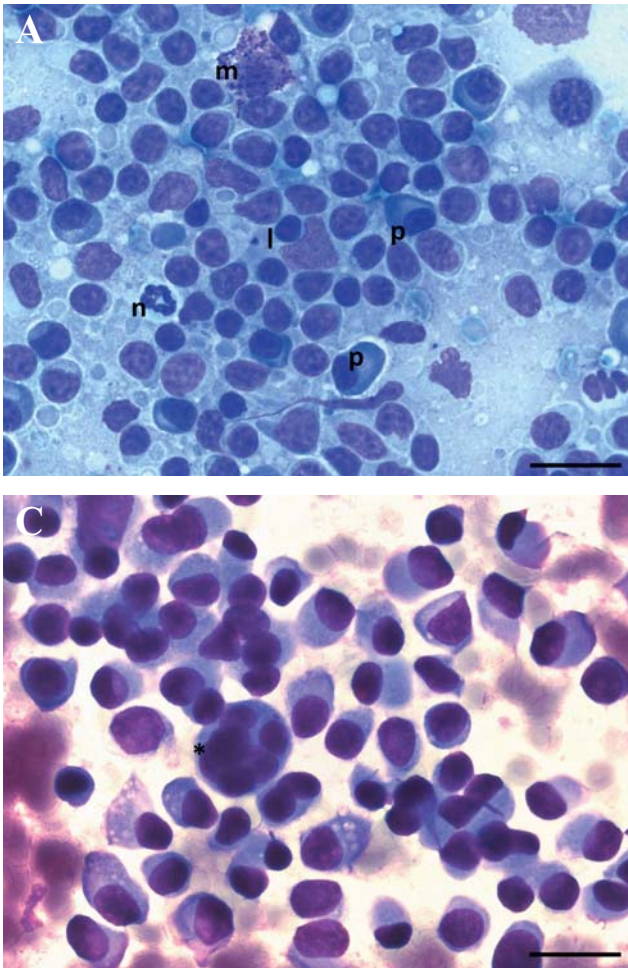
Kleine huisdieren

Het gebruik van cytologie bij kleine huisdieren is reeds goed ingeburgerd. Ze wordt voornamelijk gebruikt in het kader van de diagnostiek van verdikkingen in en onder de huid (Teske, 2009). Maar ook van prostaat, processen in de buikholte, lichaamsvloeistoffen, etc. worden cytologische beoordelingen gedaan.

Knobbels worden aangeprikt om een idee te krijgen van het proces. Door middel van cytologie is het meestal mogelijk iets over de aard (tumor/ontsteking, goedaardig/kwaadaardig) en het celype (epitheliaal/mesenchymaal) te vertellen. Zo kan de dierenarts beslissen welke behandeling het meest geschikt is en, bij chirurgische excisie, beslissen welke marges in acht worden genomen (bijvoorbeeld bij een mastceltumor zijn die anders dan bij een basaalceltumor). Bij sommige processen, zoals melkkliertumoren, is het nut van cytologie enigszins omstreden aangezien de mate van celatypie hier weinig indicatief is voor maligniteit.

Daarnaast zijn aspiraten van lymfeknopen ook veel voorkomend. Meestal moet het onderscheid gemaakt worden tussen een lymfoma (Figuur 1b) en een reactieve lymfeknoop (Figuur 1a) en dit is meestal (maar niet altijd) mogelijk door middel van cytologie.

Cytologie van inwendige organen, zoals lever, milt en nieren, wordt gedaan onder echobegeleiding door gespecialiseerde praktici. Complicaties komen zelden voor maar zijn reëel bij patiënten met stollingsstoornissen bij aspiratie van bloedrijke organen. Prostaatcytologie (rechtstreeks of een aspiratiebiopt via de urethra) wordt ook meer en meer gedaan bij honden. Verder zijn aspiraten van vocht (ascitesvocht, gewrichtsvocht, etc.) ook vrij courant. Cytologie van beenmerg is nuttig in geval van hematologische afwijkingen die niet kunnen verklaard worden op basis van het bloedonderzoek. Bij het aanprikken van tho-



Figuur 1. Voorbeelden van rondcellen. 1a. Gezwollen mandibulaire lymfeknoep bij een kat. Pleomorfe celpopulatie met kleine en grotere lymfocyten (l), plasmacellen (p), enkele neutrofielen (n) en een mastcel (m). HC. Bar = 20µm. 1b. Veralgemeende lymfadenopathie bij een hond. Monotoon celbeeld van blastaire lymfocyten passend bij een maligne lymfoma. Twee mitosefiguren zijn aanwezig (*). HC. Bar = 20µm. 1c. Massa in de mondholte bij een hond. Rondcellen met een excentrische kern en een matige hoeveelheid dens basofiel cytoplasma. Anisokaryose en een meerkernige cel zijn aanwezig (*). HC. Bar = 20µm.

racale vaste structuren is voorzichtigheid geboden wegens het risico op pneumothorax (Burkhard en Millward, 2010). In de humane geneeskunde is men bezorgd over uitzaaiingen ('seeding') van tumorcellen na het aanpakken van interne gezwellen. Volgens de auteurs werd dit in de diergeneeskunde nog maar enkel gerapporteerd bij carcinoma's (Nyland *et al.*, 2002; Vignoli *et al.*, 2007).

Vaginale cytologie wordt gebruikt voor de bepaling van het stadium van de cyclus en voor het achterhalen of er al dan niet dekking heeft plaatsgevonden. Het kan ook gebruikt worden bij teven om het tijdstip voor inseminatie in te schatten maar ze is niet de meest geschikte techniek daarvoor (Fay *et al.*, 2003).

In het algemeen is het raadzaam om in geval van verdikkingen en knobbels zonder bekende oorzaak geen antibiotica te gebruiken als diagnosticum. Er moet eerst en vooral getracht worden om tot een waarschijnlijkheidsdiagnose te komen. De eerste stap daartoe is het cytologisch onderzoek.

Paard

De belangrijkste toepassing van cytologie bij paarden is bij onderzoek van de diepe luchtwegen, meestal door middel van bronchoalveolaire spoeling of lavage (BAL). De indicaties zijn ademhalingsproblemen en er wordt gescreend op *exercise-induced pulmonary he-*

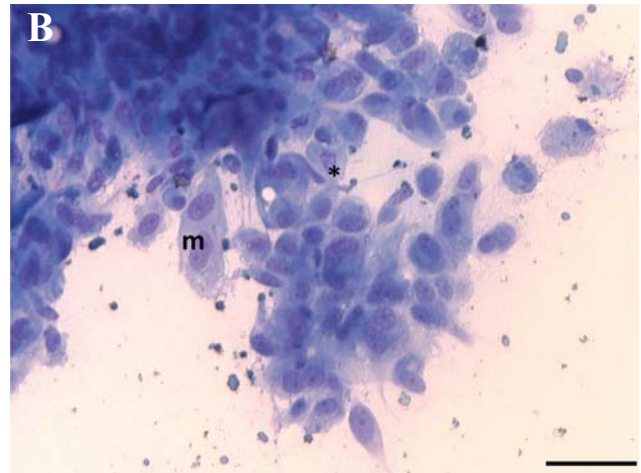
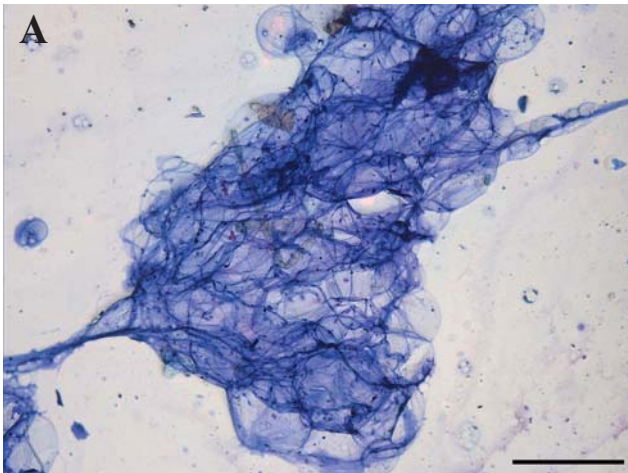
morrhage (EIPH). De beoordeling van de BAL gebeurt op basis van de verhouding van de verschillende celtypes. Bij EIPH treedt bloeding op in de long (met of zonder epistaxis). Dit wordt cytologisch zichtbaar door de aanwezigheid van erytrofagocytose of hemosiderineopstapeling in alveolaire macrofagen (Zinkl, 2002).

Bij paarden met oogletsels worden afdrukjes of "scrapings" gemaakt voor de eventuele detectie van schimmels, andere pathogenen en van tumoren. Cytologie van het endometrium maakt deel uit van het vruchtbaarheidsonderzoek bij merries en wordt gebruikt voor spermaonderzoek bij hengsten (Ley *et al.*, 2002).

Ook kunnen -zoals bij de kleine huisdieren- aspiraten van allerlei soorten cutane en inwendige massa's worden gemaakt.

Andere

Bij knaagdieren, vogels, reptielen, amfibieën en vissen heeft cytologie dezelfde toepassingen als bij honden en katten. Enige kennis van de diersoortspecifieke problemen en de normale cytologie is vereist bij de interpretatie. Ook zijn er bij bijvoorbeeld reptielen en vogels celtypes met een ander uitzicht dan bij honden en katten aanwezig, zoals gekernde rode bloedcellen en trombocyten. Bij herkauwers en varkens geldt in principe hetzelfde als bij de andere diersoorten, maar bij deze diersoorten heeft cytologie over het algemeen weinig specifieke toepassingen.



Figuur 2. Voorbeelden van mesenchymaal celtype. 2a. Zachte massa in de flank bij een hond. Typisch uitzicht van vet: deels gecollabeerde, scherp omliggende ledige ruimten met kleine excentrische kernen. HC. Bar = 250µm). 2b. Massa in de nek bij een kat. Los aggregaat van spoelvormige tot afgeronde cellen met een atypisch uitzicht, passend bij een maligne mesenchymale tumor. Gezien de anamnese en het signalement hoogstwaarschijnlijk een fibrosarcoma. Mitosefiguur (*) en meerkernige cellen (m) zijn aanwezig. HC. Bar = 50µm.

BEOORDELING VAN PREPARATEN

Hoewel het gemakkelijker is cytologische preparaten direct door te sturen naar een extern labo, is het voor de practicus om verscheidene redenen toch nuttig de basis van cytologie te kennen. Ten eerste kan een indruk van de celoogst en de kwaliteit van het preparaat worden verkregen, om zodoende de afnametechniek en het uitstrijken op punt te stellen. Ten tweede kunnen veel voorkomende typische beelden, zoals een lipoma (Figuur 2a) worden herkend en kunnen duidelijke gevallen van ontsteking en kwaadaardige processen worden onderscheiden. Dit kan reeds een voldoende indicatie zijn voor verdere behandeling. In Tabel 1 wordt een dikwijls gebruikt algoritme voorgesteld dat kan gebruikt worden als basis voor de interpretatie.

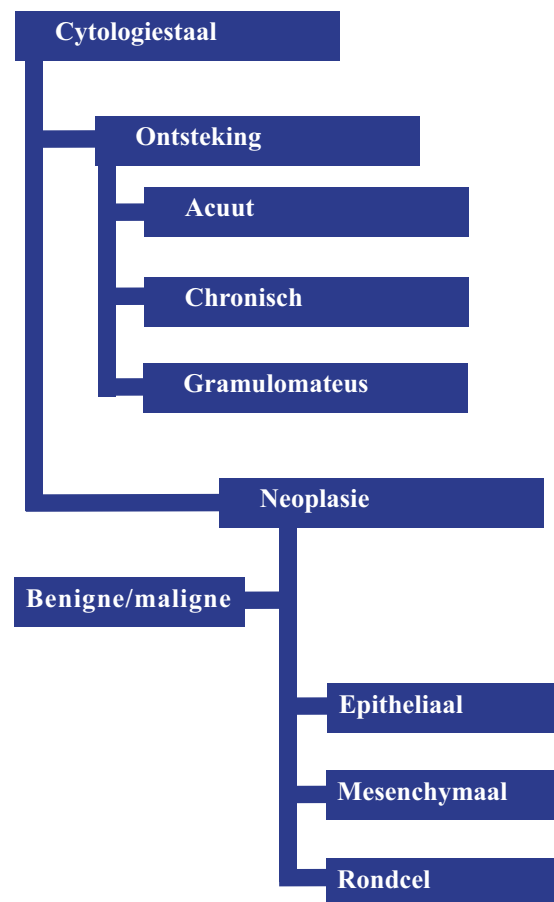
Artefacten

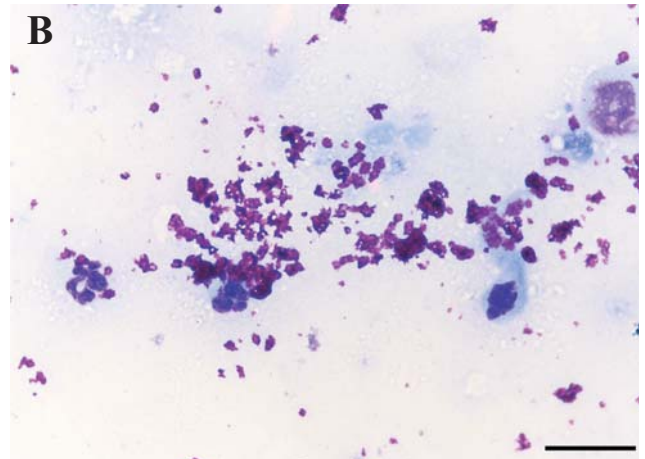
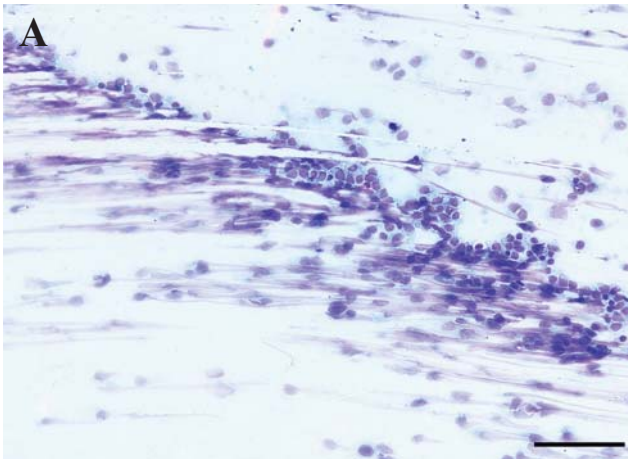
Door het gebruiken van hoge druk bij aspiratie, het te krachtig ledigen van de naald, door het te krachtig uitstrijken, te hoge temperatuur bij het drogen en het te vochtig bewaren of door condensvocht na het bewaren in de ijskast, gaan de cellen kapot. Hierdoor kunnen de meeste kernen ‘naakt’ zijn (dit wil zeggen zonder omhulling door het cytoplasma), of ze kunnen uitgesmeerd zijn en chromatineslierten vormen (Figuur 3a). Naakte kernen komen frequenter voor bij maligne tumorcellen. Dit artefact kan diagnostisch nuttig zijn, als tegelijk megalokaryose, anisokaryose en grote of multiple nucleoli gezien worden.

Het zwak aankleuren van cellen wordt gezien als niet-gefixeerde, cytologische preparaten in aanraking komen met formalinedampen (bijbeeld als cytologiepreparaten en formalinegefixeerd materiaal in eenzelfde verpakking verstuurd worden). Ook bij slechte bewaring of het te weinig vaak verversen van de verschillende kleurproducten kunnen er artefacten ontstaan.

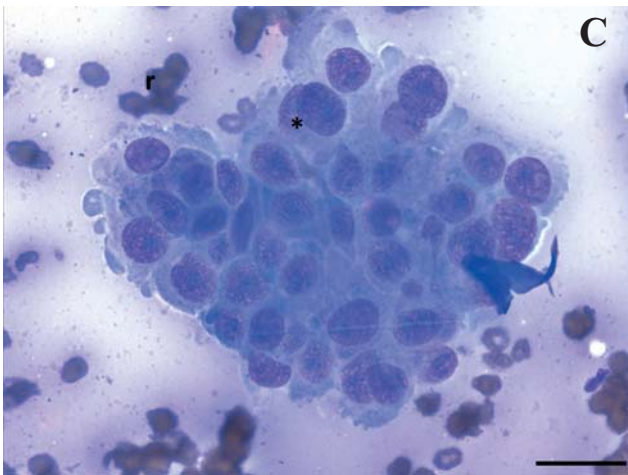
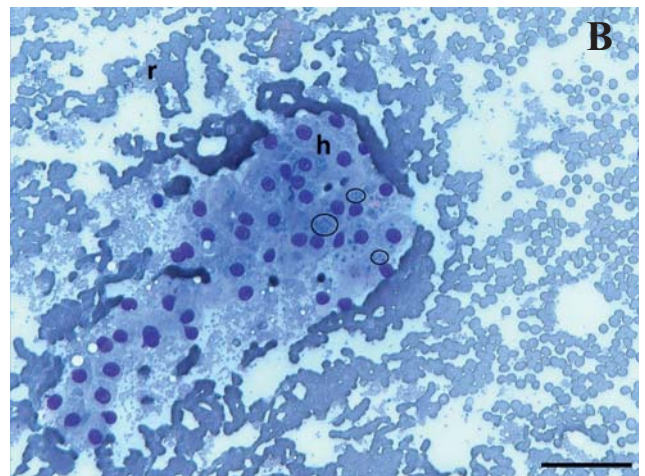
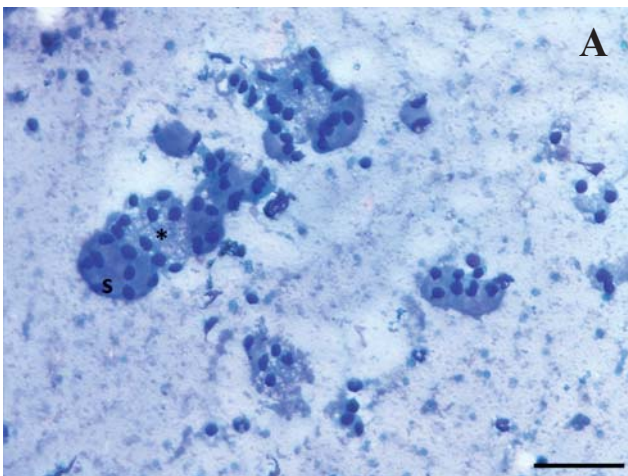
Contaminatie kan gebeuren met bloed (zie supra), maar ook met vreemde materialen. Het meest voorkomend zijn de sterk basofiele hoornschilfers afkomstig van de menselijke huid en kristallen van handschoenen (talkpoeder) en van echografiegel (Figuur 3b).

Tabel 1. Basisalgoritme voor de interpretatie van cytologiepreparaten (naar Whitbread, 2010).





Figuur 3. Voorbeelden van artefacten. 3a. Chromatineslierten veroorzaakt door het uitsmeren van kernmateriaal. HC. Bar = 50µm. 3b. Echografie gelkristallen. HC. Bar = 20µm.



Figuur 4. Voorbeelden van het epitheliaal celtype. 4a. Aspiraat van de submandibulaire regio: speekselklier bij een hond. Groepjes epitheelcellen in een min of meer acinaire vorm met een duidelijke polariteit (s). Sommige cellen hebben een gevacuoliseerd cytoplasma (*), duidend op secretaire activiteit. Achtergrond van vermoedelijk muceus materiaal. HC. Bar = 50µm.

4b. Normaal uitzicht van de lever bij een hond. Hepatocytten (h) zijn polygonaal met donkere centrale kernen die weinig variatie vertonen. De verhouding kern/cytoplasma is klein. Het omcirkelde granuleer pigment in het cytoplasma is mogelijk lipofuchsine of gal. Bloed op achtergrond (r). HC. Bar = 50µm. 4c. Hepatocellulair carcinoma bij een kat. De tumorcellen (*) hebben een grote kern-cytoplasmaverhouding, de nucleoli zijn groter en er is anisokaryose. Bloed op achtergrond (r). HC. Bar = 20µm.

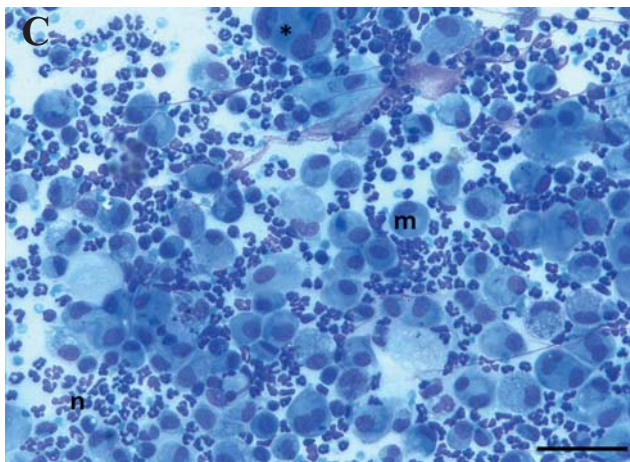
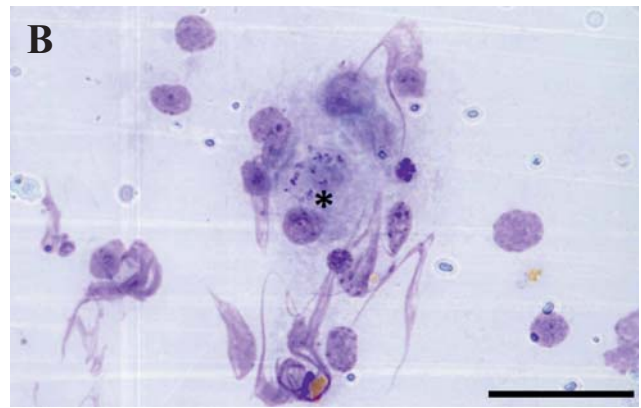
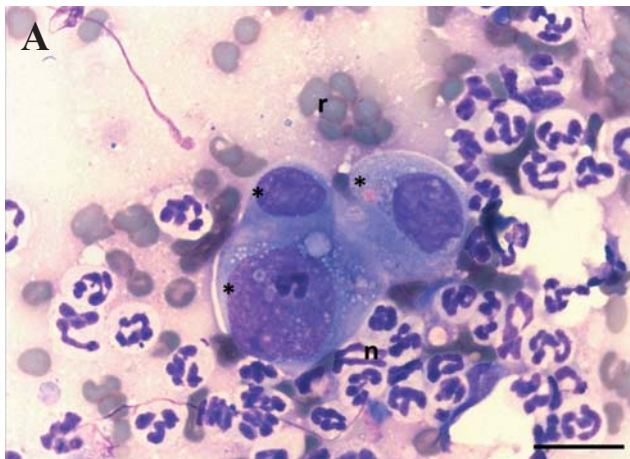
Cyste

De inhoud van een cysteus letsel kan bestaan uit hoornschilfers bij een epidermale cyste. Aspiratie is moeilijk en op cytologie zijn talrijke hoornschilfers, schollen en brokken (moeilijk te onderscheiden van contaminatie) aanwezig, al dan niet in combinatie met verhoorde cellen. Bij een jong hematoom is enkel bloed (meestal zonder trombocytengregaten) aanwezig en bij meer gevorderde hematomen zijn ook macrofagen beladen met hemosiderinegranules of hematoïdinekristallen te zien. Ontsteking kan altijd bij-

komend aanwezig zijn bij beide processen. Seromen en dergelijke geven een weinig specifiek beeld op cytologie en hebben een variabele cellulariteit met fibroblasten en ontsteking.

Normaal of hyperplastisch

Sommige uitstrijkjes van een macroscopisch nodulaire proces bestaan cytologisch uit normaal uitziende cellen. Dit wil zeggen dat ze afkomstig zijn van normaal, hyperplastisch of soms benigne tumorale weefsel. Materiaal afkomstig van een nodulaire vergroting



Figuur 5. Voorbeelden van ontsteking. 5a. Massa ter hoogte van de bovenkaak bij een kat. Uitgebreide ontstekingsreactie met neutrofielen (n) en drie atypische epitheelcellen behorende tot een squameuscel carcinoma (*). Bloed op de achtergrond (r). HC. Bar = 20µm. 5b. Lymfeknoop bij een hond. Macrophagen met intracytoplasmatische amastigoten van *Leishmania spp.* (*). HC. Bar = 20µm. 5c. Dikte van de huid bij een hond. Pyogranulomateuze ontstekingsreactie met neutrofielen (n) en macrofagen (m). Macrophagen vertonen enige anisokaryose en meerkernigheid (* = reuzencel). HC. Bar = 50µm.

ter hoogte van de kaakhoek (vermeende submandibulaire lymfeknopen) die bij aspiratie muceus materiaal en kliercellen van speekselklierorigine opleveren, is hier een voorbeeld van (Figuur 4a). Goed gedifferentieerde vetcellen op cytologie kunnen zowel tot normaal vetweefsel als tot een lipoma behoren (Figuur 2a). Prostaatepitheelcellen met een normaal uitzicht kunnen afkomstig zijn van een normale of hyperplastische prostaat.

Ontsteking

Indien de celpopulatie grotendeels bestaat uit neutrofielen, dan is het letsel hoogstwaarschijnlijk een ontsteking. Uitzonderingen hierop zijn tumoren die een sterke secundaire ontstekingsreactie uitlokken, zoals

plaveiselcel carcinoma's (Figuur 5a). Gedegenereerde neutrofielen zijn indicatief voor een infectieus proces. In dat geval moet er gezocht worden naar bacteriën. Er kunnen ook intracellulaire bacteriën aanwezig zijn. In dat geval kan contaminatie uitgesloten worden. Verder kunnen inflammatoire reacties voornamelijk bestaan uit macrofagen (granuloom of granulomateuze ontsteking, Figuur 5b), lymfocyten en eosinofielen of een mengeling hiervan. In een pyogranulomateuze ontsteking met epitheloïde macrofagen en reuzencellen moet men opletten dat de geziene atypie niet verward wordt met een tumoraal proces (Figuur 5c).

Neoplasie

In geval van een niet-inflammatoire, monomorfe celpopulatie is de eerste stap het herkennen van het celtype: epitheliaal (Figuur 4), mesenchymaal (Figuur 2) of rondcellig (Figuur 1) (Tabel 2). Met rondcellen worden cellen met een ronde vorm en een discrete aflijning bedoeld, dit wil zeggen cellen van het hemolymfa-

Tabel 2. Cytologische kenmerken van de verschillende celtypen (naar Meinkoth *et al.*, 2008).

	Rondcel	Epitheliaal	Mesenchymaal
Cellulariteit van het preparaat	Hoog	Hoog	Laag tenzij bij hogere maligniteit gemakkelijker exfoliatie
Celdistributie	Individueel, soms losse aggregaten	Clusters; parallelle plasmamembranen, soms desmosomen zichtbaar	Individueel, soms losse aggregaten
Celvorm	Afgerond met een ronde kern en variabele hoeveelheid cytoplasma	Kubisch-cylindrisch, polariteit naargelang weefselorigine, meestal duidelijke aflijning cytoplasma, soms veel cytoplasma, verhoorning	Spoelvormig tot ovaal, ovale kern, weinig aflijning cytoplasma

Tabel 3. Basisprincipes voor het cytologisch onderscheid tussen benigne en maligne (naar Teske, 2008). Onderstaande kenmerken zijn indicatief voor maligniteit.

Algemeen	Kern	Cytoplasma
<ul style="list-style-type: none"> - Variatie in celgrootte - Variatie in celvorm - Hoge/variabele kern-cytoplasma-verhouding - Macrocytose 	<ul style="list-style-type: none"> - Anisokaryose - Multipele kernen per cel - Abnormale kernvorm - Chromatinepatroon: onregelmatig, grofkorrelig, hyperchromasie - Nucleoli: meerdere, abnormale vorm, macronucleoli, variatie in grootte - Veel en atypische mitosefiguren 	<ul style="list-style-type: none"> - Verhoogde basofilie van het cytoplasma met variabele intensiteit - Atypische vacuolisatie - Abnormale cytoplasmatische inclusies

tisch systeem. Rondcellen zijn, embryogenetisch gezien, ook mesenchymaal van oorsprong maar worden apart geclassificeerd in de literatuur gezien hun cytologische kenmerken zeer verschillend zijn van de andere mesenchymale cellen. Met (cytologisch) mesenchymaal celtype bedoelt men de cellen afkomstig van de steunende weefsels (het stroma), glad spierweefsel of dwarsgestreept spierweefsel. Mesenchymale cellen komen moeilijk los van elkaar en van de matrix en geven meestal celarme preparaten. In geval van sommige mesenchymale proliferatieve letsels, zoals de meeste epuliden, is het aantal cellen te beperkt voor een interpretatie en moeten bipten voor histologie worden genomen. Rondcellen en epitheelcellen daarentegen exfoliëren gemakkelijk. Gezien de intercellulaire connecties zijn epitheelcellen meestal in clusters gelegen. Mesenchymale cellen liggen solitair of in losse aggregaten. Rondcellen hebben een afgeronde vorm, terwijl andere mesenchymale cellen min of meer spoelvormig zijn. Cytoplasmatische uitlopers zijn karakteristiek, maar afgeronde vormen zijn geen uitzondering. Epitheelcellen zijn kubisch-cylindrisch-polyhedrisch en hebben vaak een polariteit naargelang de aard van het weefsel (bijvoorbeeld de basaal gelegen kern bij klier-cellen). Het cytoplasma is meestal duidelijk afgelijnd. Uitzonderingen hierop zijn endocriene cellen waarbij het cytoplasma moeilijk zichtbaar is en de kern 'naakt' ligt. Een grote hoeveelheid cytoplasma en interconnecties tussen de cellen of cellen in aggregaten met parallelle plasmamembranen zijn indicatief voor een epitheliale origine. De architectuur van het weefsel kan soms herkend worden in cytologische preparaten (bijvoorbeeld acinusvorming).

De tweede stap is de bepaling van de digniteit van de cellen, met andere woorden nagaan of het een maligne of benigne tumor betreft. De basis van het herkennen van cytologisch maligne cellen is ten eerste pleomorfisme (variabiliteit in grootte en vorm van hetzelfde celtype) en ten tweede het abnormaal uitzicht van de kern en het cytoplasma (Tabel 3). Maligne cellen komen gemakkelijker los. De cellulariteit van het preparaat is dus verhoogd. Maligne nucleaire kenmerken zijn macronuclei, een verhoogde kern-cytoplasmaraatio, multi-pele kernen in één cel, meerdere nucleoli die groot zijn en variëren in grootte en vorm, atypische mitosefiguren en een grofkorrelig chromatinepatroon. Maligne ken-

merken van het cytoplasma zijn moeilijker te interpreteren. Verhoogde basofiliteit wijst op een hoge concentratie van RNA en kan men dus ook bij reactieve cellen zien. Atypische vacuolisatie van het cytoplasma kan een indicatie geven voor maligniteit maar is niet absoluut. Meerdere van deze criteria van maligniteit die tezelfdertijd aanwezig zijn in de celpopulatie, geven een meer betrouwbare interpretatie van het cytologisch maligne uitzicht.

Bij het volgen van deze algemene richtlijnen moet men enkele belangrijke punten in gedachten houden. Ten eerste worden deze criteria het meest gebruikt bij epitheliale tumoren, omdat ze minder voorspellend zijn wat betreft het biologisch gedrag van mesenchymale tumoren en omdat rondceltumoren meestal volgens een specifiek uitzicht van het type cel worden gediagnosticeerd (Teske, 2008). Ten tweede zijn er uitzonderingen. Sommige tumoren met maligne gedrag hebben cytologisch een weinig maligne uitzicht (bijvoorbeeld carcinoma van de anaalzak bij de hond). Anderzijds kunnen sommige cytologisch atypisch uitzijnde cellen behoren tot een relatief goedaardige tumor (bijvoorbeeld extramedullair plasmacytoma) (Figuur 1c) of zelfs tot een ontstekingsreactie (bijvoorbeeld reactieve fibroblasten vertonen meestal enige atypie en epitheloïde macrofagen) (Figuur 5c). Om tot een correcte cytologische interpretatie te komen, kan het belang van een uitgebreide anamnese niet genoeg benadrukt worden.

Infectieuze agentia

Alle bacteriën behalve enkele, zoals mycobacteriën, kleuren blauw aan met de meeste types romanowskykleuringen. Zoals hiervoor vermeld zijn intracellulaire, monomorfe bacteriën een indicatie voor primaire of secundaire bacteriële infectie. Een pleomorfe populatie bacteriën wordt gezien bij contaminatie en specifiek bij bijtewonden, vreemde voorwerpen en gastro-intestinale infecties, zoals peritonitis door darmruptuur. De meeste gisten en schimmels kleuren aan met de standaardkleuringen. Bij gisten met een dik kapsel, zoals *Cryptococcus spp.*, kan de kleuring minder duidelijk zijn doordat het kapsel niet aankleurt. Cytologie is een snelle manier om sommige protozoaire pathogenen, zoals *Leishmania spp.* (Figuur 5b), *Toxoplasma spp.* en *Neo-*

spora spp. aan te tonen, hoewel serologie en PCR een hogere sensitiviteit hebben. Ook infectie met *Babesia spp.*, *Ehrlichia spp.* en *Anaplasma spp.* kan cytologisch gedetecteerd worden door onderzoek van de “buffy coat” van bloedstalen (Otranto *et al.*, 2010). Vele DNA-virussen geven aanleiding tot typische intranucleaire insluitlichaampjes. Poxvirussen zijn één van de uitzonderingen.

BESLUIT

Cytologie is een snelle, eenvoudige en weinig invasieve techniek die talrijke toepassingen heeft in de diergeneeskunde. Meerdere technieken van de staalname en het uitstrijken kunnen worden aangewend om een goed diagnostisch staal te bekomen. Het is evenwel aan de practicus om zich hierin te bekwamen. De clinicus kan zelf de cytologische preparaten aflezen om een snelle aanvullende diagnose te bekomen of hij kan ze doorsturen voor verdere interpretatie.

REFERENTIES

- Allison R.W., Velguth K.E. (2010). Appearance of granulated cells in blood films stained by automated aqueous versus methanolic Romanowsky methods. *Veterinary Clinical Pathology* 39(1), 99-104
- Baker R., Lumsden J.H. (2000). Part 2: cytological evaluation of body systems. In: Baker R., Lumsden J.H. *Color Atlas of Cytology of the Dog and Cat*. 1st Ed., Mosby, St. Louis
- Burkhard M.J., Millward L.M. (2010). Respiratory tract. In: Raskin R.E. and Meyer D.J. *Canine and Feline Cytology: a Color Atlas and Interpretation Guide*. 2nd Ed., Saunders, Missouri, p. 145-146
- Fay J., Mezö T., Solti L., Wölfling A., Abonyi-Toth Z. (2003). Comparison of different methods used for oestrus examination in the bitch. *Acta Veterinaria Hungarica* 51(3), 385-394
- Leclere M., Desnoyers M., Beauchamp G., Lavoie J.P. (2006). Comparison of four staining methods for detection of mast cells in equine bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20(2), 377-381
- Ley W.B., Digrassie W.A., Holoyoak G.R., Slusher S.H. (2002). Endometrium, Semen quality. In: Cowell R.L. and Tyler R.D. *Cytology and Hematology of the Horse*. 2nd Ed., Mosby, Missouri, p. 73-86
- Meinkoth J.H., Cowell R.L., Tyler R.D., Morton R.J. (2008). Sample collection and preparation. Cell types and criteria of malignancy. In: Cowell R.L., Tyler R.D., Meinkoth J.H. and DeNicola D.B. *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*. 3rd Ed., Mosby, Missouri, p. 14-5, p. 27, p. 41
- Meyer D.J., Connolly S.L., Gan Heng H. (2010). The acquisition and management of cytology specimens. In: Raskin R.E. and Meyer D.J. *Canine and Feline Cytology: a Color Atlas and Interpretation Guide*. 2nd Ed., Saunders, Missouri, p. 1-14
- Nyland T.G., Wallack S.T., Wisner E.R. (2002). Needle-tract implantation following us-guided fine-needle aspiration biopsy of transitional carcinoma of the bladder, urethra and prostate. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 43(1), 50-53
- Otranto D., Testini G., Dantas-Torres F., Latrofa M.S., Diniz P.P., de Caprariis D., Lia R.P., Mencke N., Stanneck D., Capelli G., Breitschwerdt E.B. (2010). Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study. *Journal of Clinical Microbiology* 48(9), 3316-3324
- Teske E. (2008). Clinical cytology of companion animals: part I. Introduction. *The European Journal of Companion Animal Practice* 18(2), p.127-134
- Teske E. (2009). Clinical cytology of companion animals: part II. Cytology of subcutaneous swellings, skin tumours and skin lesions. *The European Journal of Companion Animal Practice* 19(1), p. 21-29
- Vignoli M., Rossi F., Chierici C., Terragni R., De Lorenzo D., Stanga M., Olivero D. (2007). Needle tract implantation after fine needle aspiration biopsy (FNAB) of transitional cell carcinoma of the urinary bladder and adenocarcinoma of the lung. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 149(7), 314-318
- Whitbread T.J. Cytology of skin tumours. In: *Proceedings of the Autumn Meeting of the British Veterinary Dermatology Study Group*, 2010
- Zinkl J.G. (2002). Lower respiratory tract. In: Cowell R.L. and Tyler R.D. *Cytology and Hematology of the Horse*. 2nd Ed., Mosby, Missouri, p. 73-86

FORCYL[®]

Marbofloxacin

NIEUW

Be Responsible
Think Short-Acting

- one shot antibioticum ter behandeling van BRD
- innovatieve* 16% marbofloxacin-oplossing
- korte wachttijden:
 - 5 dagen vlees
 - 48 uur melk



* gepatenteerde formule



FORCYL 160 mg/ml oplossing voor injectie voor runderen REG NL 107172 UDA Bevat per ml: marbofloxacin: 160 mg - benzylalcohol (E 1519): 15 mg **INDICATIES** Therapeutische behandeling van luchtweginfecties bij runderen veroorzaakt door gevoelige stammen van *Pasteurella multocida* en *Mannheimia haemolytica*. **DOSERING VOOR ELKE DOELDIERSOORT, WIJZE VAN GEBRUIK EN TOEDIENINGSWEG** De aanbevolen dosering is 10 mg/kg lichaamsgewicht, dit komt overeen met 10 ml/160 kg lichaamsgewicht als eenmalige intramusculaire injectie. Als het in te spuiten volume meer is dan 20 ml, moet dit verdeeld worden over twee of meer injectieplaatsen. Teneinde een juiste dosering te berekenen, dient het lichaamsgewicht zo nauwkeurig mogelijk te worden bepaald. Dit om onderdosering te vermijden. Eventuele lichte troebelheid of zichtbare deeltjes verdwijnen als de flacon voor gebruik geschud wordt. **CONTRA-INDICATIES** Niet gebruiken bij dieren met een bekende overgevoeligheid voor fluoroquinolonen of een van de hulpstoffen. Niet gebruiken in gevallen waarbij het betrokken pathogeen resistent is voor andere fluoroquinolonen (kruisresistentie). **BIJWERKINGEN** Toediening via de intramusculaire weg kan voorbijgaande plaatselijke reacties veroorzaken zoals pijn en zwelling op de injectieplaats die tot 7 dagen na injectie kunnen voortduren. Het is bekend dat fluoroquinolonen arthropathieën kunnen induceren. Bij runderen werden dergelijke laesies waargenomen na een behandeling met de 16% marbofloxacin-oplossing gedurende 3 dagen. Deze laesies veroorzaakten geen klinische verschijnselen en zouden reversibel moeten zijn, vooral als ze na een eenmalige toediening optreden. Er werden geen andere nadelige effecten vastgesteld bij runderen. Indien u ernstige bijwerkingen of andersoortige reacties vaststelt die niet in deze bijsluiting worden vermeld, wordt u verzocht uw dierenarts hiervan in kennis te stellen. **WACHTTIJD** (Organ)vlees: 5 dagen Melk: 48 uur **AFLIVERING** Op diergeneeskundig voorschrift **REGISTRATIEHOUDER** Vétoquinol nv, Kontichsesteenweg 42, B-2630 Aartselaar, www.vetoquinol.be. NL: Vétoquinol bv, Bruistensingel 310, 5203 DD 's-Hertogenbosch, www.vetoquinol.nl Verdere informatie is op aanvraag beschikbaar.

Vétoquinol
a Sign of Passion