

MYOSITIS NETZ STANDARDS IM MYOSITIS NETZ*: Muskel- und Hautbiopsie

Stand: 03.06.2019

Entnahme und Aufarbeitung von Muskel- und Hautbiopsien

I Skelettmuskel

Die Indikation zur Muskelbiopsie sollte von Spezialisten gestellt werden.

Die Bearbeitung der Muskelbiopsie sollte in einem Speziallabor mit Expertise für Muskelerkrankungen erfolgen.

Vor Biopsie ist ein MRT der Skelettmuskulatur empfohlen, u.a. um den Entnahmeort der Muskelbiopsie festzulegen. Der entnommene Muskel sollte klinisch betroffen, aber noch nicht komplett umgebaut sein. Bei Kindern muss die Indikation des MRT wegen zusätzlicher Narkose / Sedierung geprüft werden.

Prozedur der Biopsieentnahme

Entnahmetechnik: Offene Biopsie bei Erwachsenen und Kindern empfohlen.

Teaching videos for muscle biopsy, fixation, and sample transportation through collaboration between National Center of Neurology and Psychiatry (Japan) and Siriraj Hospital, Mahidol University (Thailand):

http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r1/video_e.html

Größe der Biopsie bei Erwachsenen: ca. 1x1x1cm³; bei Kindern ca. 0,5x0,5x1cm³

Die Muskelbiopsie muss nativ/unfixiert verarbeitet werden!

Nicht in NaCl 0.9% oder Formalin / PFA etc. oder ähnliches legen! In einer Petrischale/Gefäß mit feuchter Kompresse an der Seite (aqua dest. oder 0,9% NaCl). Nicht den Muskel auf die Gaze legen.

Die Probe zügig von dem OP in das Labor bringen. Es dürfen 120 Min. nicht überschritten werden. Ggf. gekühlt transportieren (4-6 °C). Nicht gefrieren!

Je nach Größe der Biopsie sollte die Probe im Labor in verschiedene Anteile aufgeteilt werden, wobei der größte Anteil für Kryostatschnitte sein sollte:

- Kryostatschnitte (quer)
- Elektronenmikroskopie/ Semidünnschnitte (längs und quer max. 2mm Kantenlänge)
- Biochemie (mind. 3mm)

zu a) Prozedur: Schockgefrieren der Muskulatur für Kryoastatschnitte

- die Muskelbiopsie nach der im Labor üblichen Vorgehensweise beschreiben und vorbereiten.
- Korkplättchen beschriften und mit einem sehr kleinen Klecks Tissue-Tec versehen und Muskelprobe aufsetzen (Muskelfasern unter dem Lupenmikroskop quer orientieren).
- in (Dewar-) Gefäß flüssigen Stickstoff einfüllen zu ca. $\frac{1}{3}$ bis max. $\frac{1}{2}$; darin metallenes (Stahl-) Gefäß stellen, welches mit zu $\frac{1}{3}$ mit Isopentan gefüllt ist.

CAVE Explosionsgefahr! Stickstoff darf nicht in das Isopentan kommen!

- Warten bis an der Innenwand des Gefäßes und dem Boden eine weiße Schicht entsteht (-120 bis -140°C), dann ist es kalt genug
- Korkplättchen mit einer langen Pinzette greifen, Gewebe in das Isopentan tauchen (komplett bedeckt!) und für mindestens 1min stetig bewegen
- den gefrorenen Block sofort in den Kryostaten überführen, dort ca. 10min abdampfen lassen
- Gewebe direkt schneiden oder in einem vorgekühltem Plastikgefäß einfrieren bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff

- zu b) Wenn möglich sollte extra Gewebe, welches nicht auf Kork aufgesetzt ist, in flüssigem Stickstoff asserviert werden: Ideal für Biochemie z.B. mitochondriale Atmungskettenanalyse, Western Blot Analyse, Genetik etc.
- zu c) Asservierung in Glutaraldehyd für Semidünnschnitte und Ultradünnschnitte. Diese Probe nicht direkt aus dem Randareal nehmen, da dadurch vermehrt entnahmebedingte Artefakte auftreten können.
- Fixierung einer kleinen Probe (etwa 2 mm Kantenlänge) in gepuffertem (Phosphat, Cacodylat) 2.5% GA für 24-48h
 - Einbettung in Kunstharz z.B. Araldit
 - Anfertigung von Semidünnschnitten
 - Färbung Methylenblau nach Richardson (und ggf. Paraphenyldiamin)

Standardfärbungen der Muskelbiopsie an Kryostatschnitten

HE und HE Serienschnitte	PAS
ATPase	ORO/Sudan B
(Myosin F/S)	Alkalische Phosphatase
NADH-TR	Unspezifische Esterase
SDH	Kongorot
COX; COX/SDH	EvG
Gömöri / Trichrom nach Engel	Saure Phosphatase

Zusätzlich bei Verdacht auf entzündliche Myopathie:

CD3	p62
CD8	CD31
CD68	CD 45
HLA-ABC/MHC-I	C5b-9
HLA-DR/MHC-II	

Weitere mögliche Färbungen:

CD56/NCAM	BDCA1/BDCA2
nNOS	TDP43 oder besser pTDP43
CD20/CD79a	LC3
CD4	Myosin fetal, Myosin developmental
CD138	

Bei begründetem Verdacht auf eine Muskeldystrophie/ hereditäre Myopathie:

zusätzlich Caveolin 3, Dystrophin (1, -2, -3), alpha-Dystroglycan, beta-Dystroglycan, Sarcoglycan (alpha, beta, gamma, delta), Laminin alpha 2 C- und N-Terminus, Emerin, Dysferlin, Collagen 4 in Doppelmarkierung mit Collagen VI, Laminin alpha5, Utrophin, Myosin fetal, Myosin developmental

II Haut

In Petrischale/Gefäß mit feuchter Kompresse an der Seite (aqua dest. oder 0,9% NaCl).

- a) Im Rahmen der Muskelbiopsie kleine Hautspindel: Formalinfixierung (HE) und Asservierung von Kryomaterial
- b) In Absprache mit den Dermatologen Biopsie eines befallenen Areals: Formalinfixierung (HE) und Asservierung von Kryomaterial

Wenn möglich sollte extra Gewebe in flüssigem Stickstoff asserviert werden.

*Rechtlicher Hinweis (Mitglieder des MYOSITIS NETZ sind auf der Webseite www.myositis-netz.de aufgeführt): Die „Standards im MYOSITIS NETZ“ sind im Gruppen-Konsens entwickelte Hilfen für Ärzte zur Entscheidungsfindung in spezifischen Situationen. Sie beruhen auf aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen und in der Praxis bewährten Verfahren. Die "Standards" sind für Ärzte rechtlich nicht bindend und haben daher weder haftungsbegründende noch haftungsbefreiende Wirkung. Die Standards hat das Myositis Netz unter größtmöglicher Sorgfalt und im Konsens erarbeitet - dennoch kann das Myositis Netz für die Richtigkeit des Inhalts keine Verantwortung übernehmen. Insbesondere bei Dosierungsangaben sind stets die Angaben der Hersteller zu beachten.