



Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Labor für Leukämiediagnostik
der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Direktor Prof. Dr. Dr. M. von Bergwelt

Klinikum der Universität München, Campus Großhadern
Marchioninistr. 15, 81377 München
Tel. 089-4400-74977, Fax: 089-4400-74978
email: lfl@med.lmu.de

Öffnungszeiten des Labors zur Annahme des Untersuchungsmaterials:

Mo.– Fr.	8.30 – 16:00 Uhr
Sa.	8.30 – 11.00 Uhr

Erstellung:

Zientara, Ewelina

Prüfung:

31.03.2023 Schneider, Stephanie Dr.rer.nat.

Freigabe:

31.03.2023 Zientara, Ewelina

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Inhaltsverzeichnis

1	Probenentnahme	5
1.1	venöse Blutentnahme	5
1.1.1	Häufige Entnahmefehler	7
1.2	Knochenmarks-Aspiration (Punktion) und Knochenmark-Biopsie (Stanze)	7
1.2.1	Indikationen	7
1.2.2	Aspiration (Zytologie) versus Biopsie (Histologie)	8
1.2.3	Herstellung der KM-Ausstrichpräparate	12
1.3	Punktion von Ergüssen	12
1.3.1	Interpretation	13
1.3.2	Pleurapunktionen	14
1.3.3	Peritoneal-/Aszitespunktion	15
1.3.4	Liquorpunktionen	18
1.4	Bronchoalveoläre Lavage	20
1.4.1	Indikation	20
1.4.2	Material	20
1.4.3	Praktische Durchführung	21
2	Entsorgung des bei der Probenentnahme verwendeten Materials	22
3	Benötigte Probenmengen und -arten	22
3.1	Erforderliche Antikoagulanzen	23
3.1.1	Materialentnahmen in Behälter ohne Antikoagulanzen	23
3.1.2	Materialentnahmen mit bereits mit Antikoagulanzen versehenen Röhrchen	23
3.2	Kennzeichnung des Materialgefäßes/ -röhrchens	23
3.3	Lagerung Untersuchungsmaterial bis zum Transport	23
3.4	Dringendes Untersuchungsmaterial/Einsendungen	23
3.5	Nachforderung von Untersuchungen	24
4	Untersuchungsantrag und Einverständniserklärung	24
4.1	Ausfüllen des Untersuchungsauftrags	24
4.1.1	Seite 1 Allgemeine Angaben	24
4.1.2	Seite 2 Molekulargenetik	25
4.1.3	Seite 3 Immunphänotypisierung	25
4.2	Anforderungen über das Klinische Auftragssystem KAS – KLAU anlegen (gilt nur für das KUM)	26
4.3	Ausfüllen der Patienteneinverständniserklärung/Aufklärung	26
4.3.1	Patienteninformation	26
5	Kriterien für die Probenannahme	27
5.1	Transport interner Einsender (Großhadern Rohrpostversand)	27
5.2	Transport externer Einsender	27

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

5.3	Mündliche / telefonische An- oder Nachforderung von den Einsendern	28
6	Analysendauer	28
6.1	Zytomorphologie	28
6.2	Zytogenetik	28
6.2.1	Chromosomenanalyse	28
6.2.2	Molekulare Zytogenetik (FISH Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)	28
6.3	Immunphänotypisierung	29
6.4	Molekulargenetik	29
7	Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse	30
7.1	Einflussgrößen	30
7.2	Störgrößen	30
7.3	Gründe für die Nichtbearbeitung von Untersuchungsmaterial	31
7.3.1	Zytomorphologie	31
7.3.2	Zytogenetik	31
7.3.3	Molekulargenetik	31
7.3.4	Immunphänotypisierung	31
7.4	Messunsicherheiten und Signifikanz	31
7.4.1	Zytomorphologie	33
7.4.2	Immunphänotypisierung	34
7.4.3	Humangenetik	34
8	Leistungsverzeichnis	35
9	Verpackung, Kennzeichnung und Transport des Untersuchungsmaterials	35
9.1.1	Verpackung	35
9.1.2	Kennzeichnung und Dokumentation	38
9.1.3	Transport und Versand	38
10	Befunde	39
10.1	Inhalt des Befundberichts	39
10.2	Befundbeurteilung	39
10.3	Befundausgabe und Befundübermittlung	39
11	Qualitätssicherung im Labor	40
11.1	Interne Qualitätssicherung	40
11.2	Externe Qualitätssicherung	40
12	Vorgehen bei Änderungen	41
13	Mitgeltende Dokumente	41

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Safety-Kanüle unmittelbar vor der Blutentnahme mit der S-Monovette® komplettieren und durch leichtes Drehen im Uhrzeigersinn arretieren.	6
Abbildung 2: Vene punktieren, Stauung lösen und Kolbenstange langsam zurückziehen. Bei Mehrfachentnahmen weitere S-Monovetten in die liegende Safety-Kanüle einführen und Blutproben wie oben beschrieben entnehmen.	6
Abbildung 3: Zur Beendigung der Blutentnahme zuerst die letzte S-Monovette® lösen (A) und dann die Safety-Kanüle aus der Vene ziehen. Den Nadelschutz auf einer stabilen, flachen Oberfläche aufsetzen und die Nadel bis zu einem deutlich fühl- und hörbaren "Klick" in " in den Nadelschutz einrasten (B).	6
Abbildung 4: Die bevorzugte Punktionsstelle ist die Spina iliaca posterior superior.	10
Abbildung 5: Erstellung der KM-Ausstrichpräparate	12
Abbildung 6: Punktion von Pleura	14
Abbildung 7: Peritoneal-/Aszitespunktion	17
Abbildung 8: mögliche Körperhaltungen bei Liquorpunktion	19
Abbildung 9: Einstich in kranialer Ausrichtung (ca. 10-30°). Nach Eindringtiefe von ca. 4 cm ist zunächst ein federnder Widerstand, dann der sog. „Loss of resistance“ spürbar -> Nadel ist im Duralsack. Bei Korrekter Lage der Punktionsnadel im Subarachnoidalraum tropft nach Herausziehen des Amndrins Liquor aus der Nadel.	20
Abbildung 10: UN-Nummer 3373 gilt für: Biologische Stoffe, Kategorie B (Ein ansteckungsgefährlicher Stoff, der den Kriterien für eine Aufnahme in Kategorie A nicht entspricht)	36
Abbildung 11: (A) Beispiel für eine Primärverpackung (B) Beispiel für eine Sekundärverpackung	36
Abbildung 12: Beispiel für die Außenverpackung P650 light	37
Abbildung 13: Beispiel für die Außenverpackung P650	37

Anhang 1 Untersuchungsauftrag	42
Anhang 2 Information und Einverständnis	42
Anhang 3 Einverständnis nach Gendiagnostik Gesetz incl. Widerruf	42

Änderungen zur Vorversion:

- Kapitel 3.3 Lagerung der Proben bearbeitet (Lagerung der Proben bis zum Transport, Definition Raumtemperatur).
- Rechtschreibprüfung durchgeführt
- Angaben zu WHO und ELN geändert
- Überarbeitung Kapitel 3.5

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

1 Probenentnahme

Im Labor für Leukämiediagnostik können an den verschiedensten Materialien Analysen durchgeführt werden. Welche Materialien für welche Untersuchungen benötigt werden entnehmen Sie bitte Kapitel 2.

Die Besonderheiten der Probenentnahme entnehmen Sie bitte folgenden Unterkapiteln.

Alle beteiligten Parteien tragen Verantwortung an dem Ergebnis der durchgeführten Untersuchung, der Patient/die Patientin

- Zustimmung zur Entnahme geeigneter Untersuchungsmaterialien

der Einsender (Arzt, Pflegekraft)

- Organisation der korrekten Probenentnahme
- Erstellen der Untersuchungsanforderung entsprechend der Fragestellung
- Beschriftung der Probengefäße und des Untersuchungsauftrags
- Lagerung und Transport der Probe
- Probentransport (innerhalb von **24 Stunden**)

das Labor

- Probenannahme mit Erfassung und Überprüfung des Untersuchungsauftrags
- Aufbereitung der Probe vor der Analyse

1.1 venöse Blutentnahme

Die jeweiligen Probenröhrchen, z.B. S-Monovetten®, der Firma Sarstedt sind farbcodiert:

- **ORANGE** für Lithium-Heparin (Zytogenetik)
- **ROT** für Kalium-EDTA (Zytomorphologie, Immunphänotypisierung, Molekulargenetik)

Mit den S-Monovetten® der Firma Sarstedt kann die Blutentnahme sowohl nach dem Aspirationsprinzip, als auch nach dem Vakuumprinzip erfolgen. Besonders bei problematischen Venenverhältnissen, die z. B. in Pädiatrie, Geriatrie oder Onkologie häufig vorkommen, werden die Vorteile der schonenden Aspirationstechnik deutlich. Die Wahl der Probengefäße steht jedem natürlich frei.

Bei einer Mehrfachentnahme kann die Punktion und erste Blutentnahme mit aufgesetzter Safety-Kanüle und Aspirationstechnik durchgeführt werden. Aufgrund der hohen Transparenz der Schraubkappe haben Sie den Vorteil einer sehr guten Punktionskontrolle. Alle folgenden S-Monovetten können dann, wenn es die Venenverhältnisse erlauben, nach dem Vakuumprinzip gefüllt werden. Die Safety-Kanüle bleibt während des Wechsels der S-Monovetten in der Vene liegen und ermöglicht eine tropffreie Mehrfachentnahme.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

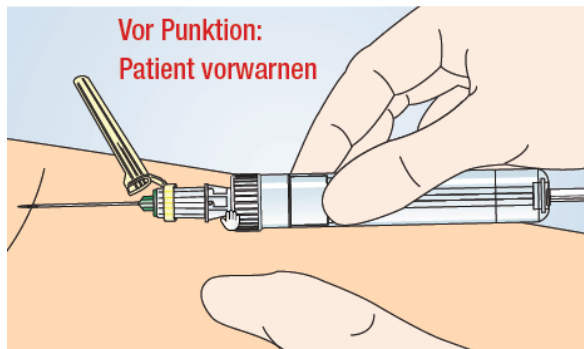


Abbildung 1: Die Safety-Kanüle unmittelbar vor der Blutentnahme mit der S-Monovette® komplettieren und durch leichtes Drehen im Uhrzeigersinn arretieren.

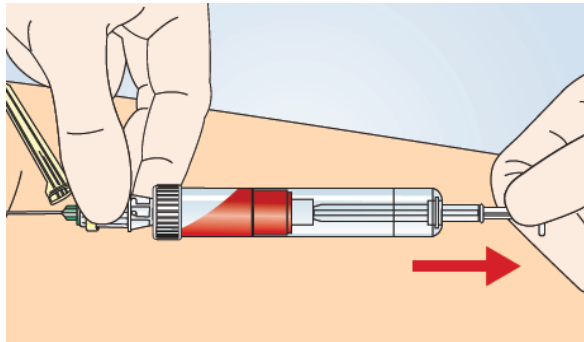


Abbildung 2: Vene punktieren, Stauung lösen und Kolbenstange langsam zurückziehen. Bei Mehrfachentnahmen weitere S-Monovetten in die liegende Safety-Kanüle einführen und Blutproben wie oben beschrieben entnehmen.

Wir möchten sie darauf hinweisen, dass die hier beschriebene Blutentnahmetechnik nur beispielhaften Charakter hat und die Wahl der Probengefäße selbstverständlich jedem freisteht.

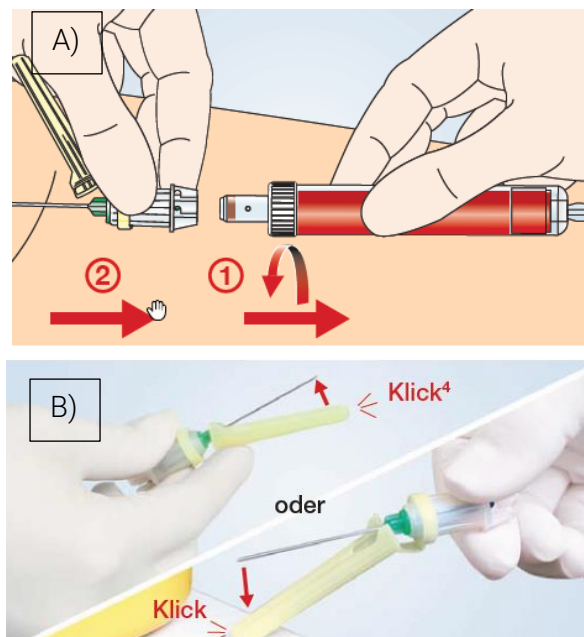


Abbildung 3: Zur Beendigung der Blutentnahme zuerst die letzte S-Monovette® lösen (A) und dann die Safety-Kanüle aus der Vene ziehen. Den Nadelschutz auf einer stabilen, flachen Oberfläche aufsetzen und die Nadel bis zu einem deutlich fühl- und hörbaren "Klick" in " in den Nadelschutz einrasten (B).

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

1.1.1 Häufige Entnahmefehler

Bei der venösen Blutentnahme werden häufig folgende Fehler gemacht:

- bei der Entnahme aus einem Venenkatheter (Infusion) müssen die ersten 3 ml verworfen werden;
- zu lange Stauung (nicht länger als 30 Sekunden)
- „pumpen“ mit der Faust
- zu dünne Kanüle
- zu starke Aspiration
- unzureichende Durchmischung
- zu starkes Schütteln

1.2 Knochenmarks-Aspiration (Punktion) und Knochenmark-Biopsie (Stanze)

(nach St. Baumgartner, A. Glasmacher)

1.2.1 Indikationen

Die Indikation ergibt sich aus der klinischen Verdachtsdiagnose entsprechend des klinischen Krankheitsbildes oder der vorliegenden Blutbildveränderungen.

Indikationen nach Krankheitsbildern

- V.a. hämatologische Neoplasien
- Anderweitig nicht geklärte Zytopenie oder Anämie, insbesondere bei V.a. MDS
- Staging-Untersuchung bei hämatologischen Neoplasien (z.B. NHL, M. Hodgkin)
- V.a. Knochenmarkmetastasierung durch einen soliden Tumor
- Verlaufskontrolle unter Therapie bei initialer Knochenmarkbeteiligung

Weitere mögliche Indikationen

- Osteologische Fragestellungen
- Angeborene Stoffwechselerkrankungen (z.B. M. Gaucher)
- Fieber unklarer Genese

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Mögliche Indikationen nach Veränderungen im peripheren Blut

- **Anämie:** nicht erforderlich, wenn Ätiologie klar (z.B. Eisenmangel)
- **Erythrozytose:** nicht erforderlich bei Sek. Polyglobulie oder relativer Erythrozytose, wohl aber zur Abgrenzung eines myeloproliferativen Syndroms
- **Neutropenie:** erforderlich
- **Leukozytose:** nicht erforderlich, wenn aufgrund anderer klinischer Daten von einer reaktiven Leukozytose auszugehen ist (z.B. Infektion, Steroid-Gabe)
- **Thrombopenie:** erforderlich, nicht erforderlich bei V.a. ITP bei Patienten unter 60 Jahren
- **Thrombozytose:** nicht erforderlich, wenn aufgrund anderer klinischer Daten von einer reaktiven Thrombozytose auszugehen ist (z.B. Infektion, Eisenmangel, etc.; dann sind aber weitere Verlaufskontrollen notwendig!)
- **Blasten:** erforderlich
- **maligne Zellen:** erforderlich

1.2.2 *Aspiration (Zytologie) versus Biopsie (Histologie)*

Eine *Aspirationszytologie* ist immer dann ausreichend, wenn allein aus der Beurteilung der Zellen die Diagnose gestellt werden kann. Eine Biopsie ist jedoch bei Erstdiagnose einer Akuten Leukämie und bei „Punctio sicca“ (hier mit Abrollpräparat für die Zytologie) immer erforderlich. Eine *Knochenmarkbiopsie* sollte jedoch stets erfolgen, wenn das Knochenmark als Ganzes betrachtet werden muss, z.B. wenn die Topographie der Verteilung der hämatopoetischen Zellen diagnostisch wichtig ist, die zugrundeliegende Erkrankung mit einer Faservermehrung im Knochenmark einhergeht oder die für die Erkennung der hämatologischen Erkrankung entscheidenden Zellen nicht aspirabel sind (z.B. M. Hodgkin) bzw. ein nodulärer Befall vorliegen könnte (z.B. NHL).

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Indikationen für Aspiration und Biopsie von Knochenmark

Erkrankung	Aspiration	Biopsie
Myelodysplastische Neoplasie	+	+
Anämie	+	-
Neutropenie	+	(+)
Thrombopenie	+	(+)
Aplastische Anämie	(+)	+
Neutrophile Leukozytose	+	(+)
Polyglobulie, Polycythaemia vera	+	-
Akute Leukämien	+	initial
Chronische Leukämien	+	+
Plasmozytom / Multiples Myelom	+	(+)
M. Waldenström	+	+
NHL	+	+
Myelofibrose	(+)	+
Leukoerythroblastisches BB	+	+
Granulomatöse Krankheiten	-	+
Knochenmetastasen	(+)	+

Die Knochenmark-Stanze wird im Labor nur zum Zweck der Anfertigung von Abrollpräparaten benötigt, oder in ganz seltenen Fällen (Punctio sicca bzw. keine Blasten im peripheren Blut) kann aus dem Material der Knochenstanze eine Chromosomenanalyse versucht werden.

1.2.2.1 Material

- schriftliche Einwilligung des Patienten zum Eingriff
- Jamshidi-Biopsienadel bzw. Sternalpunktionsnadel
- Sterile Tupfer, steriles Lochtuch, 1 Paar sterile Handschuhe
- Desinfektionsmittel
- Skalpell
- 10 ml Anästhetikum (z.B. Lidocain 2 %), Kanülen (Nr. 1, lang), 10 bzw. 20 ml-Spritzen
- Antikoagulanzen: EDTA für Zytomorphologie, Molekularbiologie und Immunphänotypisierung, Heparin für Zytogenetik
- Gefäß mit Fixierlösung für Knochenzylinder

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

- Verbandsmaterial, Sandsack

Die Aspirationszytologie mit EDTA steht immer an erster Stelle, da Heparin Kontamination durch den Spritzenkonus bei den anderen Entnahmen gravierende Färbeartefakte verursacht.

1.2.2.2 Praktische Durchführung

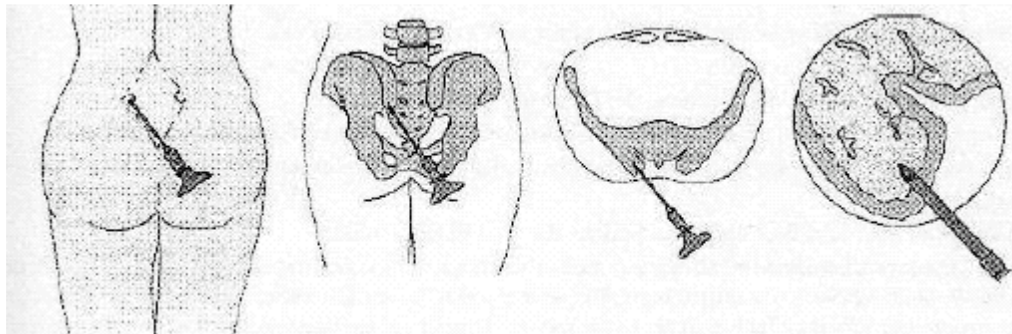


Abbildung 4: Die bevorzugte Punktionsstelle ist die Spina iliaca posterior superior.

Die Punktion erfolgt in Bauchlage oder in Seitenlage. Wird nur eine einfache Aspirationszytologie zur zytologischen Beurteilung sowie eine Knochenmarkbiopsie benötigt, können beide Entnahmen durch einmalige Punktion über die Jamshidi-Nadel erfolgen. Wird jedoch eine größere Menge Aspirationsmaterial gebraucht (beispielsweise für eine Immunphänotypisierung und für zytogenetische Untersuchungen, z.B. in der Leukämie-Diagnostik), empfiehlt es sich, sowohl eine Punktion mit der Jamshidi-Nadel (für die Stanze) als auch mit der Sternalpunktionsnadel (nach Entfernung des Sternalaufsatzes, für die Aspiration) durchzuführen.

- Er tasten der Punktionsstelle, entsprechende Markierung mit dem Fingernagel oder mit Verschlusskonus
- Gründliche Wischdesinfektion der Punktionsstelle
- Lokal Anästhesie der Punktionsstelle mit flächiger Infiltration des Periosts sterile Abdeckung mit einem Lochtuch (vorher nach Allergien fragen!)
- sterile Vorbereitung der Punktionsspritzen mit entsprechenden Lösungen (EDTA, Heparin)
- nach ausreichender Einwirkungszeit der Lokalanästhesie kleine Hautinzision mit dem Skalpell
- Einführen der Sternalpunktionsnadel (ohne Abstandshalter) bzw. der Jamshidi-Nadel
- Aufsuchen des Knochens, Punktion des Knochens unter drehenden Bewegungen bis zu einer Tiefe von ca. 1–2 cm (Durchdringen der Kompakta) in einem Winkel von ca. 70° zur Hautoberfläche nach lateral
- Entfernen des Mandrins
- Aufsetzen der Spritze (10 ml-Spritze mit ca. 1 ml EDTA für Zytologie, Immunphänotypisierung oder Molekulargenetik bzw. 20 ml Spritze Heparin für Zytogenetik)

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

- Rasche Aspiration von Knochenmarkblut (Durch Unterdruck häufig sehr schmerzhaft für den Patienten)

Bei Verwendung der Jamshidi-Nadel weiteres Vorschieben der Nadel ohne Mandrin in gleicher Stichrichtung, davor Nadel etwas rausziehen und eine neue, benachbarte Stelle finden.

- Überprüfen der Länge der Knochenstanze durch erneutes *vorsichtiges* Einführen des Mandrins (Die Stanze sollte **mind. 1 cm** lang sein; optimal: 3-4 cm)
- Lösen des Stanzzylinders aus der Umgebung durch schnelles Drehen in beide Richtungen und seitliches Abscheren durch Rüttelbewegungen
- Entfernen der Nadel unter Links-Rechtsdrehungen
- Ausstoßen der Stanze mittels Stahldraht in *umgekehrter* Richtung (von Nadelspitze Richtung Handgriff) in das vorbereitete Gefäß mit Fixierlösung (*cave*: Verletzungsgefahr! Speziellen Aufsatz verwenden)
- Verband mit etwas Druck (z.B. unter Verwendung steriler Tupfer)
- Kompression der Punktionsstelle durch Lagerung des Patienten auf dem Rücken (für ca. 30 Min); bei Thrombopenie durch zusätzliche Verwendung eines Sandsackes und ggf. Verlängerung der Liegedauer

1.2.2.3 Verhalten bei *Punctio sicca*

Es kann versucht werden, durch Drehen der Sternalpunktionsnadel, Aspiration aus verschiedenen Schichttiefen sowie Herausziehen der Sternalpunktionsnadel mit aufgesetzter Spritze und anschließendem Ausspritzen des Nadelinhaltes doch noch Material zu gewinnen. Auch die Punktion auf der Gegenseite kann manchmal erfolgreich sein.

Sind auf diese Art und Weise jedoch keine Knochenmarkbröckel zu erhalten, sollte stets eine Knochenmarkbiopsie durchgeführt werden. Durch Abrollen der knöchernen Stanze zwischen zwei Objektträgern kann ein Herausschleudern der oberflächennahen Zellen erreicht werden. Diese so gewonnenen Ausstriche können gegebenenfalls eine frühere Diagnosestellung erlauben (als wenn erst das Ergebnis der histologischen Untersuchung abgewartet werden müsste; z.B. bei akuter Leukämie mit vollem Mark).

1.2.2.4 Komplikationen

Bei ausgeprägter Thrombopenie (< 20 G/l) kann es zu Nachblutungen kommen. Aus diesem Grunde ist es in solchen Fällen besonders wichtig, einen Winkel von ca. 70° zur Hautoberfläche mit Punktionsrichtung nach lateral einzuhalten. Dadurch soll verhindert werden, dass die Nadel die Compacta von der Innenseite durchstößt und in die Weichteilgebilde des kleinen Beckens gelangt. Knochenmarkbiopsien sollten möglichst durch erfahrene Punkteure erfolgen. Im begründeten Einzelfall ist auch eine Thrombozytensubstitution vor Punktion durchaus sinnvoll. Schwere Infektionen aufgrund Knochenmarkpunktionen sind sehr selten. Bei Patienten mit bekannten Osteolysen (z.B. multiples Myelom, osteolytische Knochenmetastasen) oder auch schwerer

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Osteoporose muss die erhöhte Frakturgefährdung beachtet werden. Keine unkontrollierte Ausübung von Druck beim Vorschieben der Jamshidi-Nadel!

1.2.3 Herstellung der KM-Ausstrichpräparate

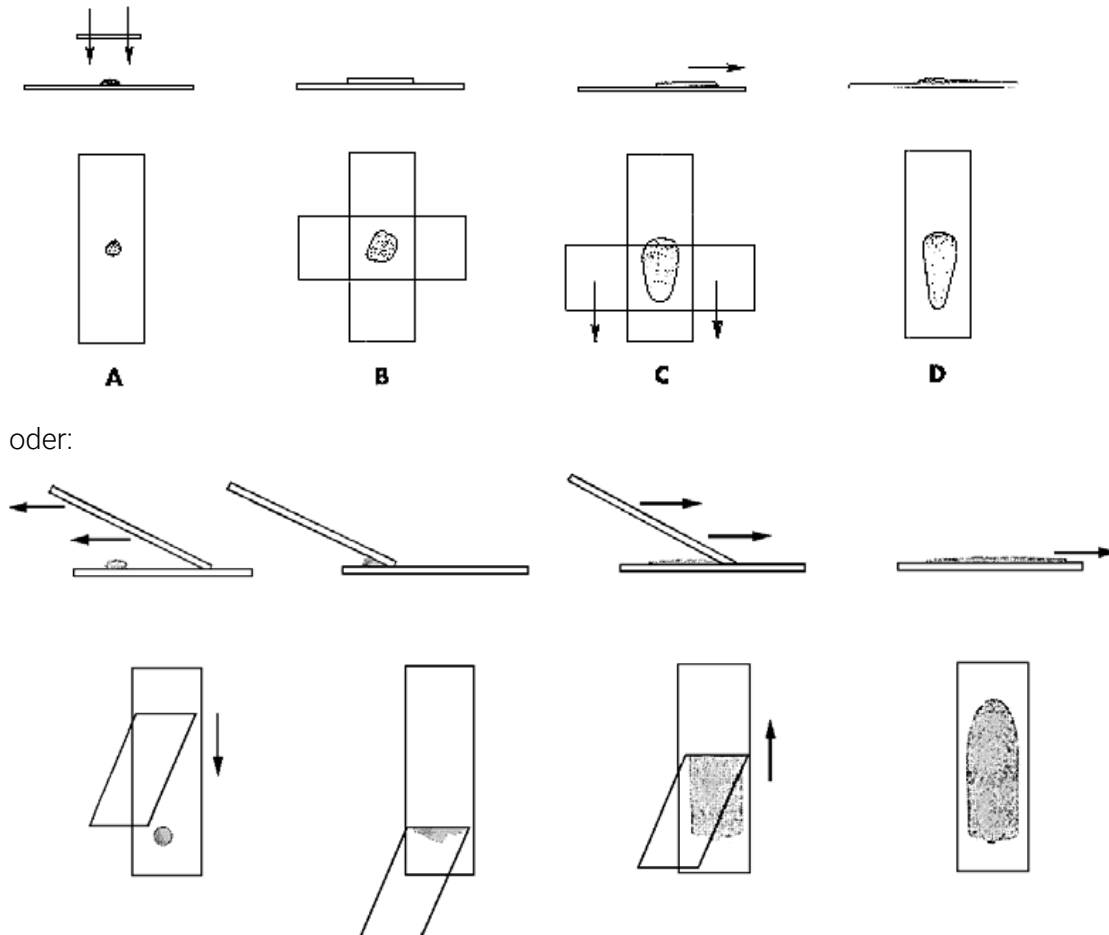


Abbildung 5: Erstellung der KM-Ausstrichpräparate

1.3 Punktion von Ergüssen

Maligne Tumoren stellen mit etwa 45% die häufigste Einzelursache für Pleura-/Perikardergüsse sowie Aszites dar. Weniger häufig sind kardiale, entzündliche und hepatische Ursachen. In einem Drittel aller tumorzellpositiven Ergüsse liefert die Zytologie den ersten Hinweis auf das Vorliegen eines bösartigen Tumors (vor allem bei Ovarial-/Bronchialkarzinomen). Tumorzellen finden sich fast ausschließlich in eiweißreichen Exsudaten (Proteingehalt >2,5 g/dl).

Bei den nicht malignen Ergüssen sind zytologisch Entzündungen, Traumata und Stauungen ätiologisch zu differenzieren. Unter den tumorzellhaltigen Ergüssen können ohne zusätzliche Untersuchungsmethoden Zellen von malignen Lymphomen, Plattenepithel-, kleinzelligen - und Adenokarzinomen sowie von malignen Melanomen (wenn Melanin nachweisbar ist) unterschieden

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

werden. Im Literaturmittel beträgt die Sensitivität der Zytologie zur Diagnose maligner Ergüsse ca. 60%, die Spezifität 97%. Auch maligne Mesotheliome werden nur zu 65% zytologisch am Erguss diagnostiziert. Die Treffsicherheit steigt aber mit der Zahl der untersuchten Proben.

Die zytologische Untersuchung eiweißreicher Ergüsse unklarer Ätiologie ist ein unverzichtbarer Bestandteil der routinemäßigen Abklärung. Sie deckt insbesondere im Verbund mit der DNA-Zytometrie und Immunzytochemie nicht nur deren meist maligne Ursache auf, sondern gibt in der Mehrzahl der Fälle auch Hinweise auf Typ und Sitz des Primärtumors.

1.3.1 Interpretation

In der Diagnostik und Interpretation von zytologischen Befunden in Ergüssen, sollten folgende Besonderheiten der serösen Höhlen (Pleura, Pericard, Peritoneum) berücksichtigt werden:

- Die Mehrzahl der Ergüsse sind in der Regel symptomatisch - reaktiv und deshalb unspezifischer Natur
- Die Zytologie muss in der Ergussdiagnostik alle morphologischen Fragen (Malignität, Histogenese und Ausgangsorgan bei metastatischen Tumoren) allein beurteilen, da hier eine histologische Bestätigung nicht erfolgt
- Die primären Krankheiten der serösen Höhlen (Hyalinose/Mesotheliome) sind äußerst selten
- Die Mesothelzelle ist eine pluripotente Zelle, die bei entzündlichen Reaktionen, wie auch bei malignen Tumoren, enorme Formvariationen zeigt. Sie kann alle im Körper vorkommenden Zellen imitieren
- Die Morphologie der Mesothelzellen und von Tumorzellen in Biopsien bzw. Tupfpräparaten weist gegenüber der Morphologie in Ergüssen sehr große Differenzen auf. Die abgeschilferten Mesothelzellen bzw. Tumorzellen im Erguss leben unter einem anderen Milieu. Dadurch erfahren sie auch eine morphologische Transformation. So kann ein histologisch plattenepithelial differenzierter Tumor z. B. im Erguss durchaus als Adenokarzinom erscheinen. Herkömmliche Malignitätskriterien sind daher im Erguss nicht immer anwendbar.
- Nicht alle malignen Tumore erscheinen zum gleichen Zeitpunkt in den Ergüssen. Das Plattenepithelkarzinom der Lunge zum Beispiel erscheint erst im sehr späten Stadium der Metastasierung im Erguss.
- Bei klinischem Verdacht auf einen malignen Erguss, sollte eine mehrmalige zytologische Untersuchung im Abstand von Tagen oder Wochen erfolgen.

Trotz der obengenannten Besonderheiten bei der Interpretation der Zytologie von Ergüssen kann eine große Anzahl von Erkrankungen im Erguss sehr sicher und zuverlässig diagnostiziert werden. Dazu zählen:

- Lymphome
- Leukämien
- Metastasierende Tumoren

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

1.3.2 Pleurapunktionen

1.3.2.1 Indikation

- diagnostische oder therapeutische Punktion eines Ergusses
- Zytostatika-Instillation

1.3.2.2 Kontraindikationen

- Blutungsanomalien (z.B. Hämophilie, Marcumar®)

1.3.2.3 Material

- entweder Punktions-Set mit Rotanda-Spritze oder 50 ml Spritze mit 3-Wegehahn und sterilen Verbindungsschläuchen (z.B. Heidelberger Verlängerung)
- 2 Punktionskanülen 16 G-grau oder 17 G-gelb, vorzugsweise ventilgesichert.
- 10 ml Lidocain 1 % mit 1 Kanüle (z.B. 21 G-grün).
- 4–5 Proberöhrchen, Blutkulturflaschen (aerob/anaerob), großes Gefäß.
- 2 Paar sterile Handschuhe, Desinfektionslösung, braunes Pflaster, sterile Tücher, sterile Tupfer

1.3.2.4 Praktische Durchführung

1. Evtl. Prämedikation mit Antitussivum, z.B. Paracetamol 1 g p.o. und Codein 40 mg p.o.
2. Pat. mit angehobenem Arm bequem sitzend platzieren (s. Abb.)
3. Sonographische Darstel
4. Markierung der Punktionsstelle dorsolateral in der hinteren Axillarlinie oder Skapularlinie im ICR unterhalb des Ergussdämpfungsrandes, aber nicht tiefer als 6.–7. ICR (Cave: Leber und lung und Markierung der Punktionsstelle Milz). Hautdesinfektion

- Zunächst mit 1 %igem Lidocain am „Oberrand der Rippe Lokalanästhetikum-Depot setzen. Dann tiefer liegendes Gewebe bis auf die Pleura parietalis infiltrieren. Durch Probepunktion die notwendige Eindringtiefe für die Punktionskanüle erkunden

- Punktionskanüle senkrecht zur Haut knapp über dem oberen Rippenrand einstechen (Cave: Gefäß- und Nervenbündel!), Kanüle etwas nach oben ziehen und weiter senkrecht vorziehen



Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

(„Zickzacktechnik“ reduziert Pneu-Risiko). Ständige Aspiration mit aufgesetzter Spritze.

- Sobald sich Pleuraflüssigkeit aspirieren lässt, Stahlnadel zurückziehen (sonst Pneu-Gefahr!) und Plastikkanüle vorschieben
- Während eines Valsalva-Manövers erst den Verbindungsschlauch, auf den unter sterilen Bedingungen ein Dreiwegehahn und ein zweiter Schlauch montiert wurde, auf das Kanülenende setzen. 20-ml-Spritze auf Dreiwegehahn setzen und Pleuraflüssigkeit für Bakteriologie usw. steril abziehen. 50-ml-Spritze auf Dreiwegehahn montieren, füllen, Dreiwegehahn drehen und Flüssigkeit durch den Schlauch ins Gefäß spülen.
- Max. 1 l/Sitzung abpunktieren (sonst Gefahr des entlastungsbedingten Lungenödems!). Hustenreiz (durch Aneinanderreiben der Pleurablätter) kündigt vollständige Drainage an
- Mit erneutem Valsalva-Manöver Kanüle entfernen, sofort Kompression mit mehrlagigem Tupfer, Pflasterverband

Cave: Pleurapunktion bei starkem Hustenreiz und Unruhe des Pat. abbrechen. Im Anschluss immer Röntgenkontrolle! Inspiratorische Aufnahme: Resterguss, expiratorische Aufnahme zum Ausschluss Pneumothorax.

1.3.2.5 Komplikationen

- Pneumothorax
- Hämatothorax
- Infektion
- Verletzung der Interkostalgefäße
- Lungenödem (e vacuo) bei zu schneller Punktion durch Unterdruck oder zu großen Punktionsmengen
- Verletzung intraabdomineller Organe

1.3.3 Peritoneal-/Aszitespunktion

1.3.3.1 Indikation

- Neu aufgetretener Aszites unklarer Ätiologie
- Bekannter Aszites mit klinischer Verschlechterung, insbesondere bei Verdacht auf eine spontan bakterielle Peritonitis
- Progredienz eines Aszites unbekannter Ursache
- Therapeutische Punktion bei schmerzhaft gespanntem Abdomen sowie bei therapierefraktärem Aszites (Diuretikaresistenz)

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

1.3.3.2 Kontraindikation

- hämorrhagische Diathese, z.B. Pat. mit Leberzirrhose und Gerinnungsstörung,
- hepatisches Präkoma,
- große Ovarialzyste,
- Gravidität,
- Hydronephrose,
- multiple Abdominal-OP oder Peritonitis in der Anamnese (Adhäsionen).

1.3.3.3 Komplikationen

- Schock, durch erneute Ödembildung und daraus resultierenden Volumenmangel
- Forcierte Ödembildung durch Eiweißverluste
- Blutungen bei Gefäßverletzungen
- Darmverletzung mit konsekutiver lokaler/diffuser Peritonitis

1.3.3.4 Vorbereitungen

- Blase entleeren lassen
- Einstichstelle rasieren (li. Unterbauch)
- (Bauchumfang messen?)

1.3.3.5 Bauchlage Material

- Hautdesinfektion Kat. III, sterile Handschuhe
- Aszitespunktionsnadel, alternativ großvolumige Braunüle Lokalanästhesie (10 ml 2 % Lidocain),
- Aszitespunktionsset (enthält in der Regel einen sterilen Beutel mit Luer-Ansatz, Dreiwegehahn und Blasenspritze im geschlossenen System). sterile Kompressen, Pflaster,
- Einmalskalpell,
- beschriftete Untersuchungsröhrchen (klinische Chemie, Hämatologisches Speziallabor/ Pathologie, Mikrobiologie).

1.3.3.6 Praktische Durchführung

- Die Aszitespunktion wird am liegenden Patienten durchgeführt
- Die Punktionsstelle wird in der Regel am linken oder rechten kaudalen Quadranten markiert (CAVE Milz/Leber), desinfiziert und mit einem Lokalanästhetikum betäubt. In der Regel wird die Markierung unter sonographischer Kontrolle durchgeführt

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

- Nach erfolgter Markierung wird die Bauchdecke mit einer Hohnadel durchstoßen. Zur Vermeidung einer Fistelbildung werden ein schräger 45° Einstich oder die „Z-Durchstichttechnik“ empfohlen. Dann wird mittels eines Adapters eine Spritze auf die Hohnadel aufgesetzt, sodass unter sterilen Bedingungen die Bauchflüssigkeit aus der Bauchhöhle entnommen werden kann.

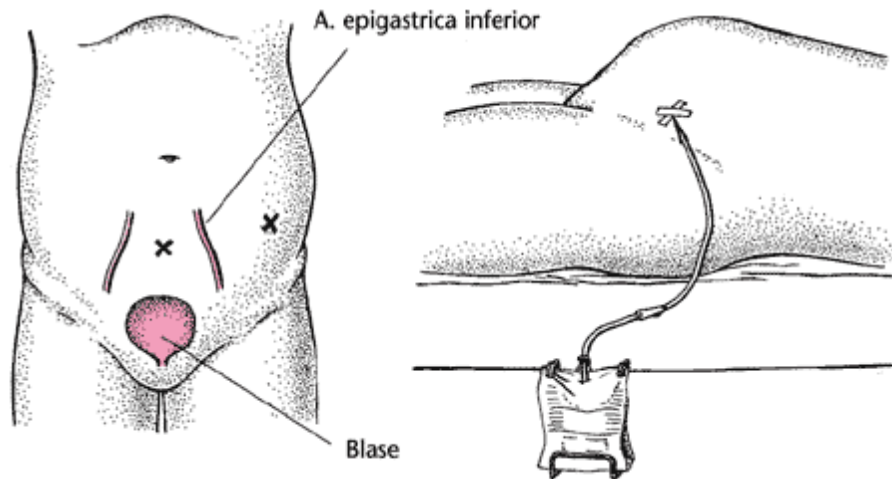


Abbildung 7: Peritoneal-/Aszitespunktion

- Bei einer Entlastungspunktion wird ein Schlauch an ein Röhrchen angeschlossen, das mit der Hohnadel verbunden ist und über das der Aszites abfließen kann. Nach Beendigung der Punktion wird die Hohnadel herausgezogen und die Punktionsstelle steril abgedeckt und verbunden.
- während der Punktion fortlaufende Kreislaufkontrollen; Schockzeichen beachten!
- Bauchbinde, Kompression zum Vermeiden eines Ödemnachlaufs
- Punktatmenge bestimmen, ab einer Menge von > 5 Litern ggf. eine Albuminsubstitution (6-8g/L) erwägen

1.3.3.7 Interpretation

Entzündlicher Aszites entsteht bei einer Peritonitis oder Pankreatitis. Ein nicht entzündlicher Aszites hingegen ist auf eine Lebererkrankung (z. B. Leberzirrhose oder Pfortaderthrombose), auf fortgeschrittene Tumoren des Verdauungstraktes oder der Eierstöcke, auf Hypoproteinämie bzw. Hypalbuminämie oder Herzinsuffizienz zurückzuführen. Zerreißt ein Blutgefäß, entsteht ein so genannter hämorrhagischer Aszites. Beim chylösen Aszites kann die Darmlymphe, der sog. Chylus, nicht mehr über den Hauptlymphgang, den Ductus thoracicus, abfließen. Die meisten tumor- oder traumabedingten Lymphabflussstörungen, der daraus folgende Lymphstau und der Übertritt von Lymphflüssigkeit aus den Lymphgefäßen in die Bauchhöhle sind daher oft Grund für die Bildung solch eines Aszites.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

1.3.4 Liquorpunktionen

1.3.4.1 Indikation

Diagnostik bei

- V.a. Infektionen des ZNS
- bakteriell: z.B. Meningo-, Pneumo-, B-Streptokokken, Haemophilus infl., Listeria monocytogenes, Borellien
- viral: z.B. Mumps, Masern, Varizellen, FSME, Herpes simplex
- Pilzinfektion
- Parasiten (opportunistische Infektion bei Immunsupprimierten)
- Chronisch entzündliche Erkrankungen: z.B. Multiple Sklerose, Guillain-Barre-Polyneuritis
- Tumore/Leukämien/Lymphome
- intrathekale Medikamentenapplikation (Glucokortikosteroide, Chemotherapie)

1.3.4.2 Material

- sterile Handschuhe, sterile Unterlage
- steriles Pflaster, sterile Tupfer, Desinfektionsmittel
- atraumatische Liquorpunktionsnadel (z.B. 22 G x 90 mm oder kleiner; die Kopfschmerzinzidenz steigt mit dem Durchmesser der Nadel)
- steriles Tuch, zum Abdecken der Haut um die Punktionsstelle und zum Ablegen des Instrumentariums
- 3-4 sterile Liquorröhrchen (beschriftet)

1.3.4.3 Praktische Durchführung

- Sitzende oder, falls sitzende Lagerung nicht möglich, seitlich liegende Lagerung des Patienten nach Ausschluss von Hirndruckzeichen. Entscheidend ist, dass der Patient einen Rundrücken macht. („Katzenbuckel“)
- Tasten der Dornfortsätze auf dem Schnittpunkt einer gedachten Linie zwischen den Oberkanten beider Beckenschaufeln mit der Wirbelsäule
- Markieren der Einstichstelle zwischen dem 4./5. oder zwischen 3./4. Lendenwirbelkörper mit dem Fingernagel. Die Haut sorgfältig desinfizieren
- Nach dem Überstreifen der sterilen Handschuhe wird die Haut um die Punktionsstelle herum abgedeckt. Eine Lokalanästhesie ist nicht zwingend notwendig, da sie den Eingriff ggf. verlängert und weil durch die Hautquaddel die Einstichstelle schwieriger zu palpieren ist. Außerdem ist der Einstich der Lokalanästhesie etwa genauso schmerzhaft wie die Punktion selbst

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

- Die Nadel wird wie eine Spritze gehalten und unmittelbar über dem unteren Wirbelkörper eingeführt. Nadel in einem Winkel von etwa 30° nach kranial und streng sagittal in Richtung Bauchnabel vorschieben. Hand dabei mit dem 4. und 5. Finger am Rücken des Patienten abstützen
- Nach Überwindung der straffen Längsbänder der Wirbelsäule und Durchstoßen der Dura nimmt der Widerstand beim Vorschieben der Nadel deutlich ab. Nadel jetzt in kleinen Schritten vorschieben. Mandrin vorsichtig herausziehen, prüfen ob Liquor abtropft
- Liquor in die bereitgestellten Röhrchen abtropfen lassen. Für die Zytologie werden mind. 1 ml benötigt, für die Immunphänotypisierung werden mind. 2 ml benötigt. Zur Zellzahlbestimmung muss zusätzlicher Liquor gleich nach Entnahme in die klinische Chemie gebracht werden. (max. 2 h haltbar, deshalb sofortiger Transport ins Labor für Leukämiediagnostik)
- Nach Beendigung der Entnahme den bis dahin steril abgelegten Mandrin zur Hälfte in die Punktionsnadel einführen, damit keine Nervenwurzel zwischen Mandrin und Kanüle eingeklemmt wird. Patienten tief einatmen lassen und die Nadel zurückziehen.
- Punktionsstelle mit einem sterilen Pflaster bedecken. Der Patient sollte die nächsten 1-2 Stunden flach auf dem Rücken liegen

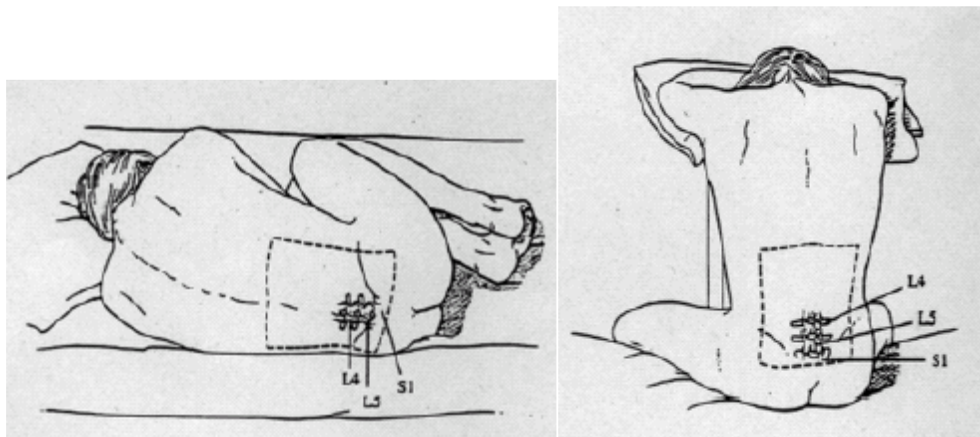


Abbildung 8: mögliche Körperhaltungen bei Liquorpunktion

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

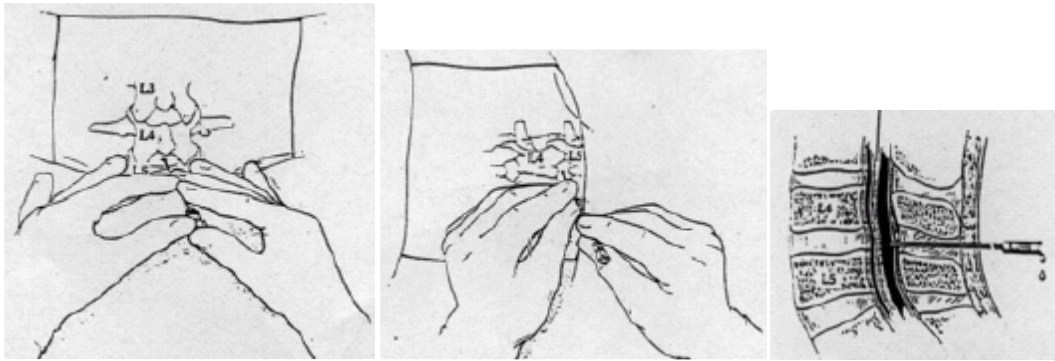


Abbildung 9: Einstich in kranialer Ausrichtung (ca. 10-30°). Nach Eindringtiefe von ca. 4 cm ist zunächst ein federnder Widerstand, dann der sog. „Loss of resistance“ spürbar -> Nadel ist im Duralsack. Bei Korrekter Lage der Punktionsnadel im Subarachnoidalraum tropft nach Herausziehen des Amndrins Liquor aus der Nadel.

1.3.4.4 Interpretation

Für die richtige Interpretation ist eine unblutige Punktion entscheidend. Meist wird mit der diagnostischen Punktion zugleich auch eine zunächst prophylaktische Gabe von Zytostatika verbunden (z.B. ALL). Durch ein einstündiges Liegen auf dem Bauch in Kopftieflage wird eine bessere Verteilung der Zytostatika nach kranial erreicht wie auch ein postpunktionelles Syndrom vermieden. Im Liquor finden sich je nach Entnahmeort, hauptsächlich Lymphozyten und in geringerem Umfang auch Monozyten. Zudem enthält Liquor cerebrospinalis Eiweiße und Zucker. Pathologischer Liquor ist oft durch das Auftreten von Erythrozyten, Granulozyten, und eine Erhöhung des Eiweiß- und Zuckergehaltes gekennzeichnet. In einem zytologischen Objektträgerpräparat werden die im Liquor enthaltenen Zellen identifiziert. Man sucht außer den oben genannten Zellarten nach Tumorzellen und Krankheitserregern wie Bakterien oder Parasiten. Die biochemische Analyse der Liquorflüssigkeit gibt Auskunft darüber, ob der Eiweiß- oder Zuckergehalt verändert ist.

1.4 Bronchoalveoläre Lavage

1.4.1 Indikation

bei Verdacht auf:

- Infektion
- interstitielle Lungenerkrankung (Sarkoidose, allergische Alveolitis)
- maligne Neoplasien, z.B. Lymphom

1.4.2 Material

10 ml BAL-Flüssigkeit (max. 2 h haltbar, deshalb sofortiger Transport ins Labor)

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

1.4.3 Praktische Durchführung

Nach Bestimmung der Zellzahl werden Zytozentrifugenpräparate angefertigt (in der Regel 2 bei ausreichendem Material) und eine **Immunphänotypisierung** kann durchgeführt werden. Es werden mehrere Zytozentrifugenpräparate für die **Zytologie** hergestellt und nach Pappenheim gefärbt. Mikroskopisch wird die Qualität der BAL beurteilt und nach Leukozyten, Blasten und Tumorzellen gesucht. Die anderen Präparate stehen dann für Spezialfärbungen zur Verfügung. Nach dem **Protokoll der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie** werden 5x20 ml NaCl instilliert mit einer Rückgewinnung von 60 -70 ml. Die Zellen sollen innerhalb von einer Stunde (max. 2 Stunden tolerabel) untersucht werden. Es wird eine **bronchoalveoläre** Lavage und nicht eine Bronchiallavage zur Beurteilung einer interstitiellen Lungenerkrankung benötigt.

Notwendige klinische Angaben:

- Diagnose
- Vorbehandlung (Medikamente)
- makroskopischer Befund

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

2 Entsorgung des bei der Probenentnahme verwendeten Materials

Die Entsorgungsvorschriften des Klinikums der Universität München LMU müssen eingehalten werden. Vorschriften unter: http://webhost.info.med.uni-muenchen.de/sicherheit/abfall_umweltschutz.htm

Ansonsten gelten die jeweiligen Entsorgungsvorschriften der Kliniken oder Praxen, in denen das Primärprobenmaterial gewonnen wird.

Es ist darauf zu achten, dass spitze Gegenstände (Kanülen, Skalpelle etc.) in durchstichsichere Abfallgefäße entsorgt werden.

Bei der Entnahme der Primärproben muss aufgrund der Kontaminationsgefahr mit infektiösen Krankheiten ein besonderer Schutz beachtet werden, wie das Tragen von Handschuhen, Schutzbrillen u. ä. Auch um eine Übertragung von Infektionen auf den Patienten zu vermeiden, sind besondere Maßnahmen zu treffen (siehe auch Kap. 1).

3 Benötigte Probenmengen und -arten

Die unterschiedlichen Analysen benötigen unterschiedliche Probenmengen, die aber auch jeweils von der Zellzahl des Materials abhängig ist

- für die Zytomorphologie: je 6-8 ungefärbte Knochenmark- und periphere Blutausstriche, auch Flüssigmaterial für im Labor selbst anzufertigende Ausstriche, mind. 1 ml Liquor, Ascites- oder Pleuraergüsse
- für die Chromosomenanalyse (Zytogenetik): möglichst 5-10 ml Knochenmark
- für die Molekulargenetik (PCR, qRT-PCR, Mutationsanalysen u.ä.): möglichst 5-10 ml Knochenmark und/oder peripheres Blut (anderes Material nur nach Rücksprache)
- für FACS/Immunphänotypisierung: möglichst 5-10 ml Knochenmark und/oder peripheres Blut (bei AML-MRD im Verlauf ungeeignet), mind. 2 ml Liquor, 5-7 ml Ascites- oder Pleuraergüsse (nur nach Rücksprache)

Da für einige Untersuchungen frische noch lebende Zellen benötigt werden, sollte eine Transportdauer von 24 h nicht überschritten werden.

Zu den zeitkritischen Proben gehören Liquorpunktate. Die Zellen im Liquor sind nicht durch Nährstoffe versorgt und gehen deshalb innerhalb kurzer Zeit unter. Zu einer qualitativ hochwertigen Analyse sollten die Liquorproben deshalb nicht älter als 2 Stunden sein.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

3.1 Erforderliche Antikoagulanzen

Je nach Untersuchungsart werden bestimmte Antikoagulanzen benötigt:

- Zytomorphologie: EDTA oder Citrat; Heparin ist nicht geeignet
- Chromosomenanalyse: ausschließlich Heparin; EDTA und Citrat sind nicht geeignet
- Molekulargenetik: EDTA
- Immunphänotypisierung: EDTA oder Citrat, Heparin auch möglich

3.1.1 *Materialentnahmen in Behälter ohne Antikoagulanzen*

Knochenmark und peripheres Blut

Zugabe von entsprechenden Antikoagulanzen (siehe 6.3)

Heparin 500 I.E./ml Material

EDTA 1,2-2 mg/ml Material (4,1 bis 6,8 mmol/L)

Citrat (0.109 mol/l oder 0.129 mol/l)

SOFORT nach Entnahme des Materials gut und gründlich mischen um ein Gerinnen des Materials zu verhindern.

Andere Materialien wie Liquor, Pleura oder Aszites nativ ohne Antikoagulanzen.

Knochenmarkstanzen/Stanzbiopsien (bei punctio sicca) für die Chromosomenanalyse kein Formalin, sondern nur mit 0,9% Natriumchloridlösung und 500 I.E. Heparin/ml.

3.1.2 *Materialentnahmen mit bereits mit Antikoagulanzen versehenen Röhrchen*

Bitte die Hinweise der Hersteller beachten.

3.2 Kennzeichnung des Materialgefäßes/ -röhrchens

Beschriftung des Röhrchens mit Patientennamen, Geburtsdatum des Patienten, sowie Antikoagulanzen, Material und Entnahmedatum.

3.3 Lagerung Untersuchungsmaterial bis zum Transport

Das entnommene Untersuchungsmaterial wird bis zur Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert (15-25°C). Temperaturen bis zu 30°C sind erlaubt. Direkte Sonnenstrahlung soll vermieden werden.

3.4 Dringendes Untersuchungsmaterial/Einsendungen

Aufgrund der zugrundeliegenden Erkrankungen die in unserem Labor diagnostiziert werden, unterliegen die meisten Probeneinsendungen einer hohen Dringlichkeit.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Es gibt jedoch auch innerhalb dieser Erkrankungen Diagnosen, die eine hohe Priorität aufweisen. Dazu gehört z. B. die Diagnose einer PML-RARA positiven AML (APL).

Die Diagnose kann nur durch das Zusammenspielen der zytomorphologischen und molekularzytogenetischen Analysen gestellt werden. Ein Ergebnis kann innerhalb von 5 Stunden geliefert werden (siehe auch VA-PA 04).

3.5 Nachforderung von Untersuchungen

Die Durchführung von zusätzlichen, auf dem Anforderungsschein nicht gestellter Untersuchungen ist prinzipiell möglich. Diese Nachforderungen können telefonisch oder per Fax gestellt werden.

4 Untersuchungsantrag und Einverständniserklärung

4.1 Ausfüllen des Untersuchungsauftrags

4.1.1 Seite 1 Allgemeine Angaben

Der aktuelle Untersuchungsauftrag liegt diesem Dokument im Anhang bei.

Labormedizinische Untersuchungen sind Leistungen, die nicht nur die Erstellung der Analyse beinhaltet, sondern auch die Interpretation und Bewertung der Analysenergebnisse.

Hierzu sind klinischen Angaben von besonderer Bedeutung. Insbesondere sollten die Indikation bzw. die Fragestellung aus dem Antrag ersichtlich sein, sowie Vortherapien, auch wenn sie schon länger zurückliegen.

Soweit für die Fragestellung relevant, sollten auch vorhandene andernorts erstellte Vorbefunde (am besten in Kopie) mitgeteilt werden.

Angaben zu Material

- Ankreuzen der beigefügten Materialart
- Anzahl der beigefügten Ausstriche bitte angeben
- Angabe Tag und Uhrzeit der Materialentnahme
- Angabe ob Erstdiagnose oder Verlauf
- Studienbezeichnung und Studiennummer wenn vorhanden
- Ankreuzen welche Untersuchung gewünscht wird (Zytomorphologie, Chromosomenanalyse, FISH, Molekulargenetik, Immunphänotypisierung)

Angaben über den Patienten

- Versicherungsstatus des Patienten angeben Privat (PKV/Wahlleistung) oder nicht privat (GKV/Überweisung)
- Geschlecht bitte ankreuzen
- Patientenetikett bitte aufkleben mit Angaben über Name, Vorname, Geburtsdatum, Adresse, Krankenversicherung (ggf. handschriftliche Angaben)

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

bei stationären Patienten bitte auch Station

Angaben zum aktuellen Blutbild

- Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten und den Hämoglobinwert
- Angaben zum Differenzialblutbild (wenn vorhanden)

Angaben zu Diagnose und bisheriger Therapie

- Diagnose bzw. die Verdachtsdiagnose eintragen
- Therapieverlauf und Zeitpunkt, z.B. Angaben zur bisher erhaltenen Therapien (Medikationen, Radiatio, Transplantationen u. ä.)

Angaben zum Einsender

- Name und Adresse des einsendenden Klinikums und/oder Arztes/Ärztin (bitte unbedingt leserlich schreiben)
- Telefonnummer, Faxnummer, Stempel

4.1.2 Seite 2 Molekulargenetik

Der „Ergänzungsbogen Molekulargenetik“ gibt dem Einsender einen genauen Einblick in die molekulargenetischen Analysen, die bei einer bestimmten Verdachtsdiagnose im Labor für Leukämiediagnostik durchgeführt werden können, um eine diagnostische und prognostische Einschätzung nach den aktuellen Richtlinien der WHO bzw. ELN zu ermöglichen. Außerdem ist klar dargestellt, welche molekulargenetischen Analysen im Unterauftrag durchgeführt werden.

Zusätzlich zur Angabe der Diagnose bzw. Fragestellung auf Seite 1, kann die Verdachtsdiagnose auf Seite 2 bei Wunsch auf eine molekulare Diagnostik nochmals ausgewählt bzw. auch ergänzt werden.

Der Einsender erhält teilweise auch die Möglichkeit spezifische molekulargenetische Analysen aktiv auszuwählen. Dies ist bei „Myeloproliferativen Neoplasien/CML“ sowie bei der „Akuten lymphatischen Leukämie“ für eine Durchführung einer *ABL1* Mutationsanalyse bei Verdacht auf eine TKI Resistenz möglich. Außerdem kann im Abschnitt „Quantitative Verlaufsdagnostik (MRD)“ der vorbekannte molekulare Marker zur molekularen Quantifizierung im Verlauf ausgewählt werden.

4.1.3 Seite 3 Immunphänotypisierung

Neben den typischen Indikationen zur Durchführung einer immunphänotypischen Diagnostik zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einer hämatologischen Neoplasie (z.B. Identifikation und Linienzugehörigkeit von akuten Leukämien und Lymphomen, Nachweis von malignen Zellen im Liquor und Ergüssen) bietet unser Labor Spezialdiagnostik an. Der „Ergänzungsbogen Immunphänotypisierung“ gibt dem Einsender genauen Einblick in die vom Labor für Leukämiediagnostik angegebene durchflusszytometrische Spezialdiagnostik.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Dabei kann der Einsender zwischen den folgenden Möglichkeiten wählen:

- Identifikation von therapierelevanten Target-Antigenen (z.B. CD20-Expression bei ALL, MM)

Hier müssen Angaben zur Grunderkrankung und zum entsprechenden Target-Antigen gemacht werden.

- Klonalitätsanalyse bei (V.a.) T-Zell-Lymphom: TCR-Analyse (TCR-V β -Repertoire Kit)

Diese Analyse soll nur bei V.a. T-Zell-Lymphom anfordert werden.

- Verlaufsbeurteilung Lymphom

Hier muss die Angabe zur Grunderkrankung gemacht werden. Falls die gesuchte Erkrankung nicht in der Auswahl erscheint, hat der Einsender die Möglichkeit die entsprechende Grunderkrankung im Feld „Sonstiges“ als Freitext einzufügen.

- Durchflusszytometrische MRD-Diagnostik

Hier muss die Angabe zur Grunderkrankung gemacht werden. Dabei gilt zu beachten, dass eine MRD-Verlaufsdagnostik für eine AML ausschließlich durchgeführt werden kann, wenn dem Labor für Leukämiediagnostik eine Erstdiagnose- bzw. Rezidiv Messung vorliegt.

Außerdem muss die Angabe zum entsprechenden Untersuchungszeitpunkt angegeben werden. Falls der gesuchte Zeitpunkt nicht in der Auswahl erscheint, hat der Einsender die Möglichkeit den entsprechenden Zeitpunkt im Feld „Sonstiges“ als Freitext einzufügen.

- CD19-CAR T-Zell-Detektion zu wissenschaftlichen Zwecken

Hier müssen die Angaben zur entsprechenden Grunderkrankung des Patienten, das verabreichte CAR-Produkt sowie das Datum der CAR-Transfusion gemacht werden.

4.2 Anforderungen über das Klinische Auftragssystem KAS – KLAU anlegen (gilt nur für das KUM)

Die Materialeinsendungen aus dem Klinikum der Universität München werden über das KAS – KLAU System angemeldet.

4.3 Ausfüllen der Patienteneinverständniserklärung/Aufklärung

Die Patienteneinverständniserklärung für die Durchführung der Untersuchungen und ggf. Nutzung überschüssigen Materials in der Forschung ist per Link im Anhang diesem Dokument angefügt.

Die Einverständniserklärung der Patienten ist bitte immer beizulegen.

4.3.1 Patienteninformation

Die Patienteninformation dient zur Aufklärung der Patienten über die bei ihnen durchzuführenden Analysen. Sie ist ein Leitfaden für den aufklärenden Arzt und es sollten sowohl ein ausgefülltes und unterschriebenes Exemplar der Patientenakte beigelegt werden, als auch ein zweites Exemplar dem Patienten mitgegeben werden.

Wir benötigen nur eine vollständig ausgefüllt und unterschriebene Kopie der Einwilligung.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Ausfüllen der Einwilligungserklärung

- Patientennamen und Geburtsdatum
- Angaben zur erfolgten Aufklärung durch behandelnden Arzt/Ärztin (Ja/Nein)
- Angaben zur Einwilligung für die durchzuführenden Untersuchungen (Ja/Nein)
- Ort, Datum
- Name, Vorname und Unterschrift behandelnder/aufklärender Arzt
- Name, Vorname und Unterschrift Patient bzw. Erziehungsberechtigter

jugendliche Patienten über 12 Jahren sollten zusammen mit ihrem Erziehungsberechtigten unterschreiben

- Angaben zur Einwilligung in Gebrauch überschüssigen Untersuchungsmaterials zu Forschungszwecken (in pseudonymisierter Form)
- Name, Vorname und Unterschrift zur Freiwilligkeit der gemachten Einwilligung

Es ist wichtig, dass alle Kreuze gemacht werden und das sowohl der aufklärende Arzt, als auch der/die Patient/in unterschreibt. Der/die Patient/in muss zweimal unterschreiben!

5 Kriterien für die Probenannahme

Untersuchungsmaterial kann nur mit einem vollständig ausgefüllten Anforderungsbogen angenommen werden. Auch muss beim Transport des Untersuchungsmaterials vom Absender dafür Sorge getragen werden, dass kein Material auslaufen kann und dadurch die Röhrchen von außen verunreinigt werden.

Vollblut und Knochenmarkaspirat ohne Zusatz von Antikoagulanzen werden vernichtet.

5.1 Transport interner Einsender (Großhadern Rohrpostversand)

Der Anforderungsbogen darf nicht zusammen mit dem unverpackten Untersuchungsmaterial (Spritzen) in einer Plastiktüte verschickt werden (siehe Kapitel Verpackung, Kennzeichnung und Transport). Sind der Anforderungsbogen, die Einwilligung und/oder die Materialverpackung stark mit Knochenmark oder Blut verunreinigt, wird nach telefonischer Ankündigung das Material wieder zurückgeschickt mit der Bitte um Reinigung bzw. um erneutes Ausfüllen des Anforderungsbogens und der Einwilligung.

Fehlende Informationen sollen telefonisch angefragt werden. Es soll dazu das Formblatt *FB-LA 02 Unvollständiges Probenmaterial* als Dokumentation dienen. Das Untersuchungsmaterial lagert bis zur abschließenden Klärung in der schwarzen Schale „Quarantäne“ am Probeneingang.

5.2 Transport externer Einsender

Aufgrund der Haltbarkeiten der eingesendeten Materialien kann das Untersuchungsmaterial von externen Einsendern nicht an sie zurückgeschickt werden. Deshalb müssen fehlende Informationen telefonisch angefragt werden. Es soll dazu das Formblatt *FB-LA 02 Unvollständiges Probenmaterial*

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

als Dokumentation dienen. Das Untersuchungsmaterial lagern bis zur abschließenden Klärung in der schwarzen Schale „Quarantäne“ am Probeneingang.

Patientenmaterial, das nicht ordnungsgemäß vom Absender verpackt wurde, muss angenommen werden. Der Einsender wird telefonisch informiert.

5.3 Mündliche / telefonische An- oder Nachforderung von den Einsendern

Nachmeldungen von Anforderungen sind untersuchungsabhängig innerhalb einer bestimmten Zeit möglich. Die Art der gewünschten Analyse ist entscheidend dafür, ob eine Untersuchung abhängig von der Lagerungszeit noch medizinisch valide durchgeführt werden kann.

An- oder Nachforderungen können jederzeit telefonisch unter 089-440074977 innerhalb unserer Öffnungszeiten angefordert werden.

Öffnungszeiten des Labors zur Probenannahme:	Mo.– Fr.	8.30 – 16:00 Uhr
	Sa.	8.30 – 11.00 Uhr

Ihr zusätzlicher Auftrag wird dann entsprechend dokumentiert und ausgeführt.

6 Analysendauer

6.1 Zytomorphologie

Die Analyse der Zytomorphologie und Zytochemie dauert in der Regel einen Arbeitstag.

6.2 Zytogenetik

6.2.1 Chromosomenanalyse

Die Analyse der Morphologie der Chromosomen ist die zeitaufwändigste Untersuchung, da die Zellen erst für 24 h bzw. 48 h inkubiert werden müssen. Danach erfolgt die Gewinnung der Metaphasen (ca. ½ Arbeitstag), die G-Bänderung (Färbung über Nacht), die Aufnahme der Metaphasen mit dem Mikroskop (½ Arbeitstag), das Karyotypisieren (ein bis zwei Arbeitstage) und letztendlich die Endkontrolle und Befundung (ein Arbeitstag).

Sind die Metaphasen von schlechter Qualität oder die Aberrationen nicht genau zu beurteilen, wird eine 24-Stunden-FISH Analyse oder eine andere FISH-Untersuchung angeschlossen, die in der Regel drei Arbeitstage benötigt.

Die Analyse der Metaphasen auf Aberrationen dauert also in der Regel etwa 10 bis 14 Arbeitstage.

6.2.2 Molekulare Zytogenetik (FISH Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)

Die Analyse der FISH-Analyse dauert in der Regel zwei bis drei Arbeitstage.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

6.3 Immunphänotypisierung

Die Analyse der Oberflächen-Antigene der Zellen für Erstdiagnosen und Lymphomverläufe dauert in der Regel zwei bis drei Arbeitstage.

Eine Ausnahme stellen MRD-Verlaufsbeefunde (AML und ALL) dar. Auf Grund der aufwändigen Auswertung und Beurteilung ist der Befund spätestens nach 21 Arbeitstagen vom Eingang fertig.

6.4 Molekulargenetik

Die Zeitdauer für molekulargenetische Analysen errechnet sich von Erhalt der ficollierten bzw. lysierten Patientenzellen bis zum fertigen Befund:

- AML Erstdiagnosen: 14 Arbeitstage (AT)
- ALL Erstdiagnosen: 7 AT
- CML Erstdiagnosen: 7 AT
- MPN Erstdiagnosen: 14 AT
- MDS Erstdiagnosen: 14 AT
- CML Verläufe: 7 AT
- AML Verläufe: 14 AT
- Schnell Diagnostik FLT3 und NPM1 bei AML Erstdiagnosen: 3 AT
- TKI Resistenztestung bei Verdacht auf ABL1 Varianten in BCR-ABL1: 3 AT
- PML::RARA qualitative PCR bei fraglichem molekularzytogenetischen Ergebnis: 2 AT
- FLT3 Diagnostik bei der APL und AML Rezidiven: 4 AT

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

7 Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse

7.1 Einflussgrößen

Einflussgrößen sind Faktoren, die in vivo zu Konzentrationsänderungen von Substanzen in dem zu untersuchenden System (Blut, Knochenmark usw.) führen. Sie sind damit unabhängig vom Analyseverfahren.

Zu den Einflussgrößen gehören unter anderem:

- Geschlecht
- Genetik (Erbfaktoren)
- ethnische Zugehörigkeit
- Lebensalter
- Medikamente

Die Einnahme von Medikamenten kann die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen beeinflussen. Eine Immuntherapie z. B. kann die Messung der Oberflächenantigene bei der FACS-Analyse beeinflussen. Zum anderen hemmen Chemotherapeutika oder andere Medikamente das Zellwachstum, was einen starken Einfluss auf das Ergebnis der zytogenetischen Analysen haben kann.

7.2 Störgrößen

Störgrößen sind Beeinflussungen in vitro, also nach der Entnahme des Untersuchungsmaterials. Sie können methodenabhängig oder methodenunabhängig sein.

Methodenabhängige Störgrößen sind unter anderem:

- Hämolyse
 - langes Stauen
 - schnelle Aspiration, sowohl bei der Blutentnahme, als auch der Knochenmarkaspiration
 - zu kleines Kanülenlumen
 - fehlende Vermischung mit den Antikoagulanzen
 - zu starkes Abkühlen oder Erwärmen
- falsches oder gar kein Antikoagulanzen
 - kein Zellwachstum bei EDTA oder Citrat für die Zytogenetik
 - Inhibierung der PCR durch Heparin
 - Färbeartefakte bei der Pappenheimfärbung durch Heparin, Beurteilung der Zellen unmöglich
 - wird gar kein Antikoagulanzen zugegeben oder nicht ausreichend gemischt koaguliert das Material und es sind keine Zellen mehr zugänglich
- Alter und Lagerung des Untersuchungsmaterials
 - ist das Material zu alt, sind die Zellen lysiert (hämolytisch) und eine Analyse ist nicht mehr möglich

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

7.3 Gründe für die Nichtbearbeitung von Untersuchungsmaterial

Allgemein gelten folgende Gründe für die Nichtbearbeitung von Probenmaterial:

- nicht oder unvollständig ausgefüllte Patienteneinverständniserklärung
- die Zellzahl ist zu gering
- das Material ist zu alt
- Material geronnen/ stark hämolytisch/ autolytisch

Da die einzelnen Analysebereiche aber auch separate Anforderungen an das Untersuchungsmaterial stellen, sind in der folgenden Liste diese nach Untersuchungsmethoden getrennt aufgeführt:

7.3.1 Zytomorphologie

- als Antikoagulanzen wurde kein EDTA oder Citrat verwendet

7.3.2 Zytogenetik

- als Antikoagulanzen wurde kein Heparin verwendet

7.3.3 Molekulargenetik

- die Qualität des Materials ist nach der cABL Messung nicht ausreichend

7.3.4 Immunphänotypisierung

- bei der ALL- und AML-MRD Diagnostik liegt kein Knochenmark vor
- Zellzahl zu gering (je nach Panel 1×10^6 Zellen pro Ansatz)
- Blastenanteil im peripheren Blut ist zu gering

7.4 Messunsicherheiten und Signifikanz

Messunsicherheiten beschreiben die Streuung der Analysen. Streuungen treten bei jedem Analyseschritt auf. Deshalb führen wir regelmäßige Kontrollen (extern und intern) durch und ergreifen Maßnahmen, um Abweichungen und Schwankungen rechtzeitig zu erkennen und auf die vorgeschriebenen Grenzen beschränken zu können. Für eine sinnvolle Interpretation unserer Laborbefunde können wir die jeweiligen Messunsicherheiten im Bedarfsfall auf Anfrage mitteilen bzw. diskutieren.

Die für die Signifikanzbetrachtung entscheidende Gesamtmessunsicherheit im medizinischen Laboratorium hängt zumindest ab von:

a) Einflussgrößen können sein

Biologisch physiologische Einflüsse, u. a.

- Geschlechtsdifferenzen,
- Alter,
- Ernährung,
- Belastungszustand,

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

- Körperlage,
- Tagesrhythmik

Einflüsse diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen

- z. B. i.m.-Injektion,
- pharmakologische Veränderung im Stoffwechsel,
- pathologische Einflüsse (Traumata, Operationen, Schock), Einflüsse, die sich aus der Probennahme ergeben (s. unten).

b) Störfaktoren (= in vitro Determinanten):

Als Konsequenz diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen,

- insbesondere Störung durch Pharmaka
- Störung durch Probenbestandteile, die noch vor Abnahme in vivo oder durch falsche Lagerung der Probe in vitro auftreten

c) insbesondere der Untersuchungsmaterialnahme als Fehlerquelle

- Einflussgrößen

(Art des Untersuchungsmaterials, Körperlage, Stauungszeit, Tageszeit, Lipämie, Hämolyse usw.)

- Störfaktoren

(Gerinnung, Hämolyse, Lagerung, Lichtexposition, Raumluft usw.)

d) der Präanalytik (Transport, Probenvorbereitung etc.)

e) der Präzision des analytischen Laborprozesses (Maß für den statistischen Fehler bei wiederholter Messung = Streuung)

Das Maß für die Präzision ist der Variationskoeffizient. Seine Größe kann stark von der Lage des Messwertes abhängig sein, z.B. kann eine Methode bei niedrigen Messsignalen eine größere relative Streuung aufweisen als bei höheren Messsignalen.

f) der Richtigkeit des analytischen Laborprozesses (Maß für die Messsystemabhängige Abweichung vom "wahren Wert")

Eine Reihe der oben aufgeführten Punkte, die die „Gesamtmessunsicherheit“ bedingen, sind stark abhängig von den individuellen Gegebenheiten der Patienten*innen. Nur in Kenntnis des betroffenen Individuums und der medizinischen Gegebenheiten kann eine Abschätzung der Höhe des Beitrags dieser Unsicherheit vorgenommen werden. Entscheidend ist die Erkenntnis, dass diese Beiträge für

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

sehr viele Analyte wesentlich größer sind als die eigentlichen analytischen Variablen der Messunsicherheit (Richtigkeit und Präzision).

Wir nehmen regelmäßig an Ringversuchen bei INSTAND e.V., des Berufsverbandes deutscher Humangenetiker und UKNEQAS teil.

Wir haben uns bemüht, die für die Beurteilung der Gesamtmessunsicherheit wichtigen Spezifika der einzelnen Analyte, wie Einflussgrößen und Störfaktoren in diesem Dokument aufzulisten.

Die Mitarbeiter*innen des Labors stehen zur Diskussion der Signifikanz eines Befundes jederzeit zur Verfügung. Sie werden die aktuellen Daten zur analytischen Messunsicherheit sowie Überlegungen zur Präanalytik in die Diskussion des Individualbefundes einbringen.

Der nicht zum klinischen Bild passende Laborbefund

Häufig werden unerwartet pathologische Befunde als klinisch nicht signifikant deklariert. Dies sollte nicht geschehen, da

1. eine entscheidende Veränderung im Krankheitsverlauf versäumt werden könnte und
2. Mängel bei der Probenentnahme, dem Transport und der Analytik nicht aufgedeckt würden und somit beibehalten werden.

Deshalb ist eine Rücksprache mit dem Labor zur Klärung der möglichen Ursachen dringend erforderlich.

7.4.1 Zytomorphologie

Für die Zytomorphologie liegen keine publizierte Untersuchung zum individuellen Einfluss von verschiedensten Faktoren oder deren Kombination auf die Messunsicherheiten vor. Es ist jedoch davon auszugehen, dass durch z.B. fehlende Bröckel im Knochenmark. Probleme in der Präanalytik, weitere Einflussgrößen wie z.B. Tagesrhythmik oder Störfaktoren wie z.B. Störung durch Pharmaka die Messunsicherheit zunimmt. Eine Reihe dieser Punkte, die die „Gesamtmessunsicherheit“ bedingen, ist stark von den individuellen Gegebenheiten beim Patienten abhängig und können nur unzureichend kontrolliert werden. Eine Abschätzung des Beitrags dieser Unsicherheit kann nur in Kenntnis des betroffenen Individuums und der medizinischen Gegebenheiten vorgenommen werden. Entscheidend ist die Erkenntnis, dass diese Beiträge für sehr viele Analyten wesentlich größer sind als die eigentlichen analytischen Variablen der Messunsicherheit. Im Rahmen der Qualitätskontrolle wird die analytische Präzision und Richtigkeit für alle quantitativen Parameter ständig aktualisiert und überprüft. Es erfolgt eine regelmäßige Teilnahme an Ringversuchen, um Messunsicherheiten nach Möglichkeit zu kontrollieren. Hierzu gehört auch die Nichtbearbeitung von Untersuchungsmaterial bei z.B. unzureichender Qualität. Siehe hierzu Kapitel 7.3.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

7.4.2 Immunphänotypisierung

Die Messunsicherheit von Untersuchungsergebnissen in der Durchflusszytometrie sind von verschiedenen Faktoren abhängig. Die Angabe eines definierten Abweichungswert erscheint aufgrund der unterschiedlichen Fehlerquellen nicht zielführend, da u.a. auch patienten- und materialspezifische (peripheres Blut, Knochenmark, Liquor und andere Ergüsse) Variablen die Messung beeinflussen. Neben diesen Faktoren sind hier vor allem die Art des Antikoagulans (EDTA vs. Heparin) und die Alterung der Probe (z.B. bei externen Einsendern) zu nennen, welche Einfluss auf die Qualität der Messungen haben. Um den Fehler möglichst gering zu halten wird im Labor – nach Möglichkeit – EDTA-Blut/Knochenmark für die durchflusszytometrische Analyse eingesetzt. Um möglichen Einflüssen der Messgeräte zu minimieren werden diese wöchentlich mit standardisierten Probenmaterial (CD-Chex) kontrolliert. Um Instabilität von Fluorochromen (z.B. bei Tandem-Konjugate) vorzubeugen werden die angesetzten Mastermixe für maximal 14 Tage genutzt und anschließend verworfen und neu angesetzt. Ein weiterer wichtiger Punkt für die *multicolor* Durchflusszytometrie ist außerdem die korrekte Kompensation der Probe, da es hierdurch zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen kommen kann. Daher wird die Kompensation nach der Messung von qualifiziertem Personal überprüft und – falls nötig – auch angepasst. Zur sicheren Unterscheidung von positiven und negativen Signalen werden für die jeweiligen Panel spezifische Isotypkontrollen mitgeführt anhand derer das nachfolgende Gating vorgenommen wird.

7.4.3 Humangenetik

Definition der Messunsicherheit laut 2S-Leitlinien „Humangenetische Diagnostik und genetische Beratung (Glossar zu „Modul molekulargenetische Diagnostik“ ohne Seitenangabe):

„Messunsicherheit Die Messunsicherheit des Schätzwertes grenzt einen Wertebereich ein, innerhalb dessen der wahre Wert der Messgröße liegt. Eine Wahrscheinlichkeit dazu ist nicht angebbar. Das Ergebnis einer Messung ist erst durch Schätzer und Messunsicherheit definiert. Sinn und Ziel des Schätzens von Messunsicherheiten ist es, Intervalle festzulegen, die die wahren Werte der Messgrößen einschließen oder „lokalisieren“ sollen. Ein Schätzwert der Messunsicherheit ist für alle quantitativen Analysen relevant (zum Beispiel Repeat-Expansionen, Fragmentlängenanalysen, Southern-Blot-Analysen). Insbesondere die Unterscheidung von grenzwertigen Messwerten erfordert die Kenntnis der Messungenauigkeit, um eine fundierte Unterscheidung zwischen „normal“ und „pathologisch“ zu ermöglichen.“

7.4.3.1 Zytogenetik

Das Analyseergebnis eines Befundes mit einem pathogenen Karyotyp kann in der Regel mit hoher Sicherheit als „echt“ und damit nachgewiesen betrachtet werden. Der Nachweis eines „normalen“ Karyotyps ohne pathologische Variante hingegen, kann nicht mit völliger Sicherheit belegen, dass die aberranten Zellen in Kultur gewachsen sind.

Das gleich gilt für Interphase-FISH Analysen: Liegt ein negatives Ergebnis vor, bedeutet das nicht automatisch auch einen unauffälligen Karyotyp. Ist z. B. der Blastenanteil im Ausgangsmaterial zu

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

gering, können kleine Varianten übersehen werden (die Analyseergebnisse liegen um die „cut-off“-Werte der einzelnen FISH-Sonden).

7.4.3.2 Molekulargenetik

Das Ergebnis eines Befundes mit einer pathogenen Variante ist in der Regel mit einer hohen Sicherheit nachgewiesen. Wird in dem untersuchten Gen keine krankheitsverursachende Variante gefunden, so kann nicht mit völliger Sicherheit ausgeschlossen werden, dass in der untersuchten Region oder anderen nicht untersuchten Genen eine solche Variante vorliegt, wenn z. B. der Blastenanteil im Ausgangsmaterial ist zu gering ist. Dadurch lässt sich auch eine genetische Veranlagung für eine Krankheit meist nicht mit völliger Sicherheit ausschließen.

8 Leistungsverzeichnis

Siehe FB-PÄ 07 Leistungsverzeichnis.

9 Verpackung, Kennzeichnung und Transport des Untersuchungsmaterials

Von Menschen entnommenes Untersuchungsmaterial (Patientenproben), bei denen eine minimale Wahrscheinlichkeit besteht, dass sie Krankheitserreger enthalten, unterliegen NICHT den Vorschriften des ADR (Europäisches Übereinkommen über die Beförderung gefährlicher Güter auf der Straße), wenn die Probe in einer Verpackung befördert wird, die jegliches Freiwerden des Inhalts verhindert und die mit dem Aufdruck „FREIGESTELLTE MEDIZINISCHE PROBE“ gekennzeichnet ist (Absatz 2.2.62.1.5.6 des ADR).

9.1.1 Verpackung

Verpackungen für medizinische Untersuchungsmaterialien müssen grundsätzlich so beschaffen sein, dass sie allen üblicherweise beim Transport auftretenden Belastungen standhalten und jegliche Freisetzung des Inhalts verhindert wird. Das gilt für jeglichen Versand.

Die Verpackung wird als den oben aufgeführten Vorschriften entsprechend angesehen, wenn sie folgende Bedingungen erfüllt:

- a) Die Verpackung besteht aus drei Bestandteilen:
 - (i) einem wasserdichten Primärgefäß (Spritze, Monovette etc., siehe Abb. 2A)
 - (ii) einer wasserdichten Sekundärverpackung (Abb. 2B)
 - (iii) und einer ausreichend festen Außenverpackung (Abb. 2C) (mindestens eine Oberfläche muss die Mindestabmessung von 100 x 100 mm aufweisen)

Die Sekundärverpackungen sind mit geeignetem Polstermaterial, in die Außenverpackung einzusetzen. Bei flüssigen Stoffen muss außerdem zwischen der Primär- und Sekundärverpackung

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

ausreichend absorbierendes Material eingesetzt werden, um ein freisetzen der Flüssigkeit zu verhindern.

Diese Verpackungen entsprechen bis auf einige Erleichterungen der Verpackungsanweisung P650 der ADR und werden daher oft als „P650 light“ bezeichnet (Abb. 2C).



Abbildung 10: UN-Nummer 3373 gilt für: Biologische Stoffe, Kategorie B (Ein ansteckungsgefährlicher Stoff, der den Kriterien für eine Aufnahme in Kategorie A nicht entspricht)

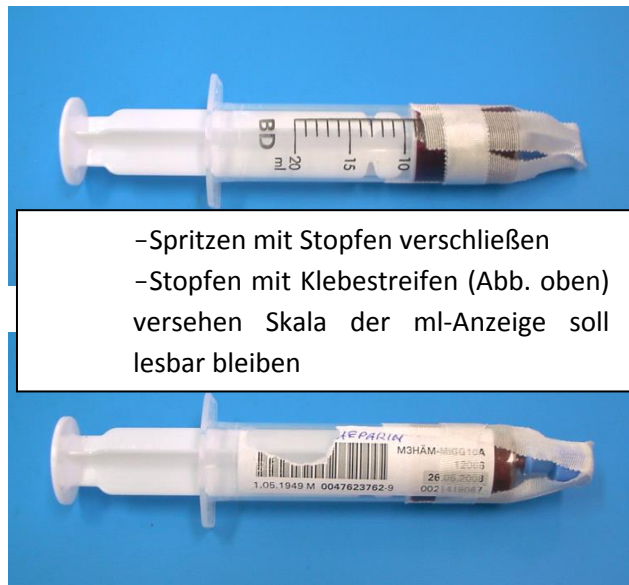


Abbildung 11: (A) Beispiel für eine Primärverpackung



(B) Beispiel für eine Sekundärverpackung

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Die Verpackungen der Verpackungsanweisung P650 für infektiöse Patientenproben und Kulturen der Kategorie B (UN-Nr. 3373) (siehe Abb. 1) entsprechen in ihrem Aufbau denen für freigestellte Patientenproben (Dreifachverpackung). Bei der P650 muss jedoch entweder die Sekundär- oder die Außenverpackung starr sein. Zusätzlich muss entweder das Primär- oder das Sekundärgefäß einer Druckdifferenz von 95 kPa standhalten. Ferner muss das gesamte Versandstück in der Lage sein, einen Falltest von 1,2 m Höhe unbeschadet zu überstehen (siehe Abb 2D).



Abbildung 12: Beispiel für die Außenverpackung P650 light

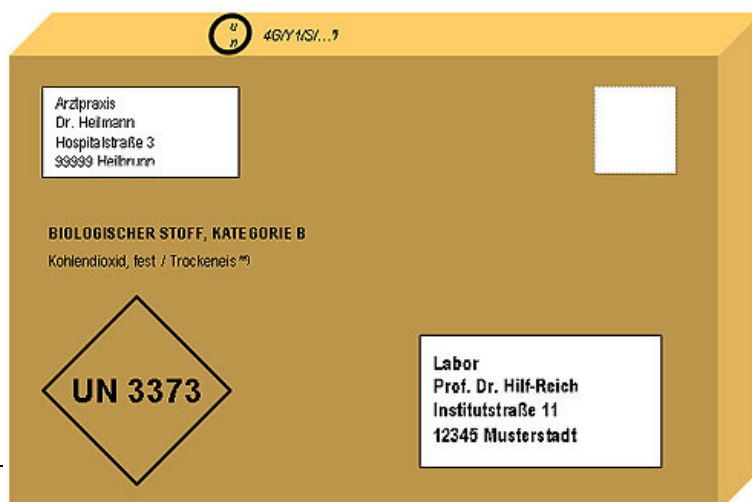


Abbildung 13: Beispiel für die Außenverpackung P650

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

9.1.2 Kennzeichnung und Dokumentation

Freigestelltes Untersuchungsmaterial ist neben der Angabe von Absender und Empfänger deutlich als „freigestellte medizinische Proben“ zu kennzeichnen.

9.1.3 Transport und Versand

Die Versanddauer sollte nicht länger als 24 h betragen. Dies wird durch Transportdienste mit 24-h-Expressservice (z. B. von TNT, UPS, DHL u.a.) gewährleistet. Bei einem Versand am Freitag muss darauf geachtet werden, dass „Samstagszustellung“ und „vor 10.00 Uhr“, angekreuzt wird. Ein Versand des Untersuchungsmaterials für Samstag oder an Feiertagen sollte möglichst vorher angekündigt werden (Tel: 089-4400-74977).

Weiterhin sollte bei einem Versand vor Feiertagen darauf geachtet werden, dass Feiertagszustellung angekreuzt ist. Bitte achten Sie besonders auf die nicht bundeseinheitlichen Feiertage: 06.01. Heilige drei Könige, zweiter Donnerstag nach Pfingsten - Fronleichnam, 15. 08. Mariä Himmelfahrt und 01.11. Allerheiligen.

Alternativ ist der Versand mit der Deutschen Post als Brief „National“ möglich.

Beim internem Versand des Untersuchungsmaterials mit der „Rohrpost“ gelten die gleichen Bedingungen wie unter 5.1 beschrieben.

Da es sich bei allen eingesendeten Materialien um humanes Material handeln, sollten alle Proben ohne Kühlaggregate oder ähnliches versendet werden (siehe auch Kap. 3.3).

Sollte der Patient/die Patientin unter bekannten Kälteantikörpern leiden, ist es erforderlich das Untersuchungsmaterial in einem Thermobehälter ins das Labor zu senden. Eine telefonische Ankündigung im Vorfeld ist dann erforderlich.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

10 Befunde

Die Einsender werden in Abhängigkeit von der Analysendauer (siehe Kap. 3) zeitnah über die Ergebnisse der Analysen benachrichtigt. Die Übermittlung der regulären Befunde erfolgt per Fax, Rohrpost und/oder postalisch bzw. elektronisch über KAS (interne Einsender). Bei kritischen Befunden werden die Einsender zusätzlich telefonisch benachrichtigt. Die Dokumentation über die Befundbenachrichtigung erfolgt in der LfL-Datenbank.

10.1 Inhalt des Befundberichts

Der Befundbericht enthält neben dem Namen und dem Geburtsdatum des Patienten, auch die Materialart, das Abnahme- und das Eingangsdatum des Probenmaterials sowie die jeweilige Uhrzeit vermerkt. Weiterhin ist die interne Labornummer, und soweit vorhanden die Diagnose auf dem Befundbericht vermerkt.

Dazu kommt die Befundbeurteilung.

In der Zytogenetik kommen außerdem noch folgende Angaben hinzu:

- Angaben zum Untersuchungsverfahren
 - Art der Probenaufbereitung (hier Kulturzeiten und Stimulantien)
 - Art der Bänderungstechnik aufgeführt
 - Art des Untersuchungsmaterials aufgeführt
 - Angabe der in drei Metaphasen max. erreichten Bandenauflösung (ca. –Werte) für normale diploide Karyotypen
 - Angabe der in drei Metaphasen max. erreichten Bandenauflösung (ca. –Werte) für aberrante Karyotypen
 - Angaben des Karyotyps gemäß ISCN (ISCN, An International System for Human Cytogenomic Nomenclature, Ed. McGowan-Jordan J., Simons A., Schmid M., Karger) in der aktuell gültigen Fassung.

10.2 Befundbeurteilung

Die Befundbeurteilung erfolgt anhand der Erkrankung und der Therapie des Patienten. Die Grundlage der Beurteilung beruht auf der WHO Klassifikation (*The WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues*), Cancer Cytogenetics (*Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells*; Heim, Mitelman).

10.3 Befundausgabe und Befundübermittlung

Alle Befundberichte werden in PDF-Format elektronisch gespeichert. Die Befundberichte werden an die Einsender gefaxt und auch auf postalischem Weg (externe Einsender) versendet. Für interne Einsender erfolgt die Befundübermittlung über klinischen Arbeitsplatz in SAP. Im KAS werden auch alle Befunde archiviert.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

11 Qualitätssicherung im Labor

11.1 Interne Qualitätssicherung

Die Maßnahmen für die interne Qualitätssicherung werden ausführlich in der Verfahrensanweisung VA-QK 01_Analytische Qualitätssicherung im Labor beschrieben.

11.2 Externe Qualitätssicherung

Das Labor für Leukämiediagnostik beteiligt sich im Rahmen der Qualitätssicherung in regelmäßigen Abständen an Ringversuchen der folgenden Anbieter:

- **INSTAND e.V.**
 - Zytomorphologie
 - Immunphänotypisierung
- **Ringversuche des Berufsverbandes Deutscher Humangenetiker e.V. (BVDH)**
 - Zytogenetik (Tumorzytogenetik)
 - Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) (Tumorzytogenetik)
- **UK NEQAS Leukocyte Immunphenotyping programm**
 - BCR-ABL and AML Translocation Identification Programme (Accredited)
 - NPM1 Mutation Status (Accredited)
 - FLT-3 Mutation Status (Accredited)
 - BCR-ABL1 Minor Quantification (Not Accredited)
 - BCR-ABL1 Major Quantification (Accredited)
 - Acute Myeloid Leukaemia and Myelodysplastic Syndrome Gene Panels (Not Accredited)
 - Myeloproliferative Neoplasms Gene Panels (Not Accredited)
 - BCR-ABL1 Kinase Domain Variant (Mutation) Status
 - JAK2 p.Val617Phe (V617F) Mutation Status
 - Post-Stem Cell Transplant Chimerism Monitoring

Weiter hat das Labor für verschieden Analyten Laborvergleiche mit dem Labor für molekulare Hämatologie und Onkologie der Uniklinik Köln, Prof. Dr. Kreuzer und dem MVZ Martinsried, Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik, Dr. Klein, Dr. Rost und Partner aufgebaut.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

12 Vorgehen bei Änderungen

Werden neue Methoden eingeführt werden die Haupteinsender darüber informiert. Werden etablierte Methoden verändert, werden die Einsender nur dann informiert, sofern die Änderungen große Auswirkungen auf die Ergebnisse haben.

13 Mitgeltende Dokumente

- Leistungsspektrum des Labors für Leukämiediagnostik
- Patienteninformation und Einverständniserklärung
- Untersuchungsauftrag
- [Europäisches Übereinkommen über die internationale Beförderung gefährlicher Güter auf der Straße](#); ADR-2009
- Thum et al., Versand von medizinischem Untersuchungsmaterial Neue Bestimmungen ab 2007; Bundesärztekammer, Dt. Ärzteblatt, Jg. 104, Heft 46, 16. 11. 2007
- Heim und Mitelman, Cancer Cytogenetics: Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells, in der aktuell gültigen Fassung
- ISCN: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature, in der aktuell gültigen Fassung
- WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, in der aktuell gültigen Fassung
- Fuchs et al., Maligne Lymphome Diagnostik, Therapie, 2007
- Fuchs et al., Manual Hämatologie 2008
- Nguyen et al., Flow Cytometry in Hematopathology, A Visual Approach to Data Analysis and Interpretation, 2003

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Anhang 1: [Untersuchungsauftrag](#)

Anhang 2: Information und Einverständnis

Deutsche Version

<http://qmportal.info.med.uni-muenchen.de/MED3-Lfl/Lists/QMSPDF/Information%20und%20Einverst%C3%A4ndniserkl%C3%A4rung.pdf>

Englische Version

<http://qmportal.info.med.uni-muenchen.de/MED3-Lfl/Lists/QMSPDF/Information%20und%20Einverst%C3%A4ndnis%20ENGLISCH.pdf>

Anhang 3: Einverständniserklärung nach Gendiagnostik Gesetz incl. Widerruf

Deutsche Version

<http://qmportal.info.med.uni-muenchen.de/MED3-Lfl/Lists/QMSPDF/Einwilligungserkl%C3%A4rung%20zur%20Durchf%C3%BChrung%20genetischer%20Analysen%20gem%C3%A4%C3%9F%20GenDG%20mit%20Widerrufsformular.pdf>

Englische Version

<http://qmportal.info.med.uni-muenchen.de/MED3-Lfl/Lists/QMSPDF/Einverst%C3%A4ndniserkl%C3%A4rung%20nach%20GenDinG%20ENGLISCH.pdf>