



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
Marchioninstr. 15, 81377 München
Tel. 089-4400-74977, Fax: 089-4400-74978
email: lf@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:

25.11.2024 Zientara, Ewelina

Freigabe:

25.11.2024 Schneider, Stephanie Dr.rer.nat.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Inhaltsverzeichnis

1	Konformitätshinweis mit DIN EN ISO 15189	6
2	Probenentnahme	6
2.1	Materialentnahmen in Behälter ohne Antikoagulanzen	6
2.2	Materialentnahmen mit bereits mit Antikoagulanzen versehenen Röhrchen	7
2.3	Kennzeichnung des Materialgefäßes/ -röhrchens	7
2.4	Lagerung Untersuchungsmaterial bis zum Transport	7
2.5	Indikationen für Analysen aus verschiedenen Materialien	7
2.6	Häufige Entnahmefehler	9
2.7	Aspiration (Zytologie) versus Biopsie (Histologie)	10
2.8	Indikationen für Aspiration und Biopsie von Knochenmark	10
2.9	Verhalten bei Punctio sicca	11
2.10	Interpretation	11
2.10.1	Ergüsse	11
2.10.2	Aszites	12
2.10.3	Liquor	12
3	Entsorgung des bei der Probenentnahme verwendeten Materials (interne Einsender)	13
4	Benötigte Probenmengen und -arten	13
4.1	Dringendes Untersuchungsmaterial/Einsendungen	14
4.2	Nachforderung von Untersuchungen	14
5	Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse	15
5.1	Einflussgrößen	15
5.2	Störgrößen	15
5.3	Gründe für die Zurückweisung von Untersuchungsmaterial	16
5.3.1	Zytomorphologie	16
5.3.2	Zytogenetik	16
5.3.3	Molekulargenetik	16
5.3.4	Immunphänotypisierung	16
6	Kriterien für die Probenannahme	17
6.1	Transport interner Einsender (Großhadern Rohrpostversand)	17
6.2	Transport externer Einsender	17
7	Untersuchungsantrag und Einverständniserklärung	18
7.1	Ausfüllen des Untersuchungsauftrags	18
7.1.1	Seite 1 Allgemeine Angaben	18
7.1.2	Seite 2 Molekulargenetik	19

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

7.1.3	Seite 3 Immunphänotypisierung	20
7.2	Anforderungen über das Klinische Auftragssystem KAS – KLAU anlegen (gilt nur für das KUM)	21
7.3	Ausfüllen der Patienteneinverständniserklärung/Aufklärung	21
7.3.1	Patienteninformation	21
8	Analysendauer	22
8.1	Zytomorphologie	22
8.2	Zytogenetik	22
8.2.1	Chromosomenanalyse	22
8.2.2	Molekulare Zytogenetik (FISH Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)	22
8.3	Immunphänotypisierung	22
8.4	Molekulargenetik	22
8.5	Messunsicherheiten und Signifikanz	23
8.5.1	Zytomorphologie	25
8.5.2	Immunphänotypisierung	25
8.5.3	Humangenetik	25
8.6	Beschreibung der Risikoanalysen zum Restrisiko	26
9	Leistungsverzeichnis	26
10	Verpackung, Kennzeichnung und Transport des Untersuchungsmaterials	26
10.1	Integrität der Probe	27
10.2	Verpackung	27
10.3	Kennzeichnung und Dokumentation	29
10.4	Transport und Versand	29
11	Befunde	29
11.1	Inhalt des Befundberichts	29
11.2	Befundbeurteilung	30
11.3	Befundausgabe und Befundübermittlung	30
11.4	Beratungsleistungen	30
12	Qualitätssicherung im Labor	30
12.1	Interne Qualitätssicherung	30
12.2	Externe Qualitätssicherung	31
13	Vorgehen bei Änderungen	32
14	Mitgeltende Dokumente	32

Abbildungsverzeichnis

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Abbildung 1: UN-Nummer 3373 gilt für: Biologische Stoffe, Kategorie B (Ein ansteckungsgefährlicher Stoff, der den Kriterien für eine Aufnahme in Kategorie A nicht entspricht)	27
Abbildung 2: (A) Beispiel für eine Primärverpackung (B) Beispiel für eine Sekundärverpackung	28
Abbildung 3: Beispiel für die Außenverpackung P650 light	28
Abbildung 4: Beispiel für die Außenverpackung P650	28

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Indikationen für Untersuchungen anhand des Materials	7
Tabelle 2: Indikationen der Analysen anhand der Erkrankung	10
Tabelle 3: Materialanforderungen	13
Tabelle 4: Angaben für die Nachforderung von Analysen	14
Tabelle 5: Lagerung des Probenmaterials im Labor	17

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

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Änderungen zur Vorversion:

Extern erbrachte Laboraktivitäten (Probenentnahme und Transport) werden aus Akkreditierungsumfang des Labors für Leukämiediagnostik ausgeschlossen (siehe DIN EN ISO Kap. 5.3.1)

Kap. 5.1.1 angepasst (Angaben zum Pkt. 7.2.3 der DIN EN ISO 15189: Anforderungen zur Durchführung von Laboruntersuchungen)

Kap. 5.3.1 Patienteninformation aktualisiert (keine Einwilligung vom Patienten in Notfallsituationen) siehe DIN EN ISO 15189 Kap. 7.2.4.3

Kap. 8.3 Gründe für die Zurückweisung von Untersuchungsmaterial aktualisiert (Ausnahme bei kritischen oder unersetzlichen Proben) siehe DIN EN ISO 15189 Kap. 7.2.6.2

Kap. 12.1 aktualisiert (Restrisiken)

Kap. 4.2 Eingefügt Angaben zu Nachforderungen von Analysen

Kapitel 1 überarbeitet

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

1 Konformitätshinweis mit DIN EN ISO 15189

Wir bitten zu beachten, dass alle extern erbrachte Laboraktivitäten (u.a. Probenentnahme und deren Transport bis zum Eintreffen im Labor für Leukämiediagnostik) von unserem Akkreditierungsumfang ausgeschlossen sind.

2 Probenentnahme

Im Labor für Leukämiediagnostik können an den verschiedensten Materialien Analysen durchgeführt werden. Welche Materialien für welche Untersuchungen benötigt werden entnehmen Sie bitte [Kapitel 3](#).

Die Besonderheiten der Probenentnahme entnehmen Sie bitte folgenden Unterkapiteln.

Alle beteiligten Parteien tragen Verantwortung an dem Ergebnis der durchgeführten Untersuchung:

❖ Patientinnen

- Zustimmung zur Entnahme geeigneter Untersuchungsmaterialien

❖ der Einsender (Arzt, Pflegekraft)

- Vorbereitung des Patienten
- Organisation der korrekten Probenentnahme
- Erstellen der Untersuchungsanforderung entsprechend der Fragestellung (Bereitsstellung klinischer Angaben, Medikation)
- 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
- Lagerung und Entsorgung der verwendeten Probengefäße

Die Entnahme der Primärproben darf ausschließlich von medizinisch geschultem Personal nach interne und gesetzlichen Vorgaben durchgeführt werden. Eine Einwilligung (schriftlich) in die Prozeduren der Patient:innen wird vorausgesetzt. Deshalb wird an dieser Stelle auf eine ausführliche Beschreibung verzichtet.

2.1 Materialentnahmen in Behälter ohne Antikoagulanzen

Knochenmark und peripheres Blut

Zugabe von entsprechenden Antikoagulanzen (siehe 6.3)

Heparin 500 I.E./ml Material

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

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.

2.2 Materialentnahmen mit bereits mit Antikoagulanzen versehenen Röhrchen

Bitte die Hinweise der Hersteller beachten.

2.3 Kennzeichnung des Materialgefäßes/ -röhrchens

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

2.4 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.

2.5 Indikationen für Analysen aus verschiedenen Materialien

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

Tabelle 1: Indikationen für Untersuchungen anhand des Materials

Material	Indikationen	Kontraindikationen	Materialanforderungen
Knochenmarkaspirat	• 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 • Osteologische Fragestellungen • Angeborene Stoffwechselerkrankungen (z.B. M. Gaucher)		

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

peripheres Blut	• Fieber unklarer Genese • 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		
Liquor	• 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		1 ml für Zytomorphologie. Mind. 2 ml für Durchflusszytometrie (auf Anfrage kann Stabilisierungsmedium im Labor angefordert werden). Natives Material max. 2 h haltbar, deshalb sofortiger Transport ins Labor.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

	• Tumore/Leukämien/Lymphome • intrathekale Medikamentenapplikation (Glucokortikosteroide, Chemotherapie)		
Körperhöhlenergüsse	• diagnostische oder therapeutische Punktion eines Ergusses • Zytostatika-Instillation	• Blutungsanomalien (z.B. Hämophilie, Marcumar®)	
Peritoneal-/Aszitespunktion	• 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)	• hämorrhagische Diathese, z.B. Pat. mit Leberzirrhose und Gerinnungsstörung, • hepatisches Präkoma, • große Ovarialzyste, • Gravidität, • Hydronephrose, • multiple Abdominal-OP oder Peritonitis in der Anamnese (Adhäsionen)	
BAL	• Infektion • interstitielle Lungenerkrankung (Sarkoidose, allergische Alveolitis) • maligne Neoplasien, z.B. Lymphom		10 ml BAL-Flüssigkeit (max. 2 h haltbar, deshalb sofortiger Transport ins Labor)

2.6 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

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

2.7 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).

2.8 Indikationen für Aspiration und Biopsie von Knochenmark

Tabelle 2: Indikationen der Analysen anhand der Erkrankung

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.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

2.9 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).

2.10 Interpretation

2.10.1 Ergüsse

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 abgeschlifferten 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.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

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

2.10.2 Aszites

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.

2.10.3 Liquor

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.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

3 Entsorgung des bei der Probenentnahme verwendeten Materials (interne Einsender)

Die [Entsorgungsvorschriften](#) des Klinikums der Universität München LMU müssen eingehalten werden.

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).

4 Benötigte Probenmengen und -arten

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

Tabelle 3: Materialanforderungen

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

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

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

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.

4.1 Dringendes Untersuchungsmaterial/Einsendungen

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

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).

4.2 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.

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

Ihre Nachforderung wird dann entsprechend dokumentiert und ausgeführt.

Nicht in allen Analysebereichen ist eine Nachforderung von Untersuchungen möglich bzw. ist die Nachforderung aufgrund des Materials und der Arbeitsschritte möglich. Wir beraten Sie hierzu gerne.

Tabelle 4: Angaben für die Nachforderung von Analysen

Anforderung	KM	PB	Liquor
Zytomorphologie	Am gleichen Tag der Einsendung	Am gleichen Tag der Einsendung	Innerhalb von 2 h

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Immunphänotypisierung	Bis zu 3 Tagen nach der Einsendung	Bis zu 3 Tagen nach der Einsendung	Innerhalb von 2 h
Chromosomenanalyse	Am gleichen Tag der Einsendung	Am gleichen Tag der Einsendung	-
FISH	Wenn Material archiviert, sonst am gleichen Tag der Einsendung	Wenn Material archiviert unbegrenzt, sonst am gleichen Tag der Einsendung	Innerhalb von 2 h
Molekularanalysen	Wenn Material archiviert 3 Monate, sonst am gleichen Tag der Einsendung	Wenn Material archiviert 3 Monate, sonst am gleichen Tag der Einsendung	Innerhalb von 2 h

5 Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse

5.1 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.

5.2 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

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

- 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

5.3 Gründe für die Zurückweisung 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:

5.3.1 Zytomorphologie

- als Antikoagulanzen wurde kein EDTA oder Citrat verwendet

5.3.2 Zytogenetik

- als Antikoagulanzen wurde kein Heparin verwendet

5.3.3 Molekulargenetik

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

5.3.4 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

Hinsichtlich der medizinischen Versorgung im Interesse des Patienten kann im Einzelfall nach Rücksprache mit dem Einsender bzw. der Leitung des Labors entschieden werden, ob die

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Probe trotzdem bearbeitet werden kann. Dies wird entsprechend in der Datenbank des LFL dokumentiert. Wird die Probe angenommen, so muss nach Abwägung des Risikos für die Patientensicherheit im Befund auf die Art des Problems hingewiesen und ggf. zur Vorsicht bei der Interpretation von Ergebnissen geraten werden.

6 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.

6.1 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.

6.2 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* 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.

Tabelle 5: Lagerung des Probenmaterials im Labor

Materialart	Lagerungs-temperatur	Aufbewahrungszeit	Aufbewahrungsort
peripheres Blut pB	Raum-temperatur	3-5 Tage	gelbe WIVA-Box am Probeneingang
Knochenmark KM	Raum-temperatur	3-5 Tage	gelbe WIVA-Box am Probeneingang
mononukleäre Zellen	4-8°C	1 Tag	Kühlschrank Nr. 25

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

aus pB oder KM			
Pleurapunktat	4-8°C	1 Tag	Kühlschrank Nr. 25
Ascitespunktat	4-8°C	1 Tag	Kühlschrank Nr. 25
Liquor	4-8°C	Bis zu 3 Tagen mit TransFix® stabilisiert (anschließend nur für FACS-Analyse)	Kühlschrank Nr. 25
RLT-Reste	-20°C	6 Monate	7K 02 610
RLT-Reste	-80°C	unbegrenzt	7K U2 655
Objektträger Morphologie Zytogenetik	aus und Raumtemperatur	10 Jahre (nach Volljährigkeit des Patienten)	7K 02 610
Objektträger Ausstriche für FISH	Raumtemperatur	3 Monate	7K 02 610
FISH-Objektträger	4-8°C	3 Monate	7K 02 610
M-FISH-Objektträger	4-8°C	6 Monate	7K 02 610
Fix-Reste	-20°C	unbegrenzt	7K U2 655
gDNA	4-8°C bis -80°C	unbegrenzt	7K U2 655
cDNA	-20°C	6 Monate	7K 02 610
cDNA	-80°C	unbegrenzt	7K U2 655
Zellpellets	-80°C	unbegrenzt	7K U2 655
viable Zellen	-80°C	max. 2 Wochen (dann in N2 im ELLF unbegrenzt)	7K U2 655 ELLF

7 Untersuchungsantrag und Einverständniserklärung

7.1 Ausfüllen des Untersuchungsauftrags

7.1.1 Seite 1 Allgemeine Angaben

Der aktuelle Untersuchungsauftrag liegt diesem Dokument im Anhang bei. Es soll immer in Papierform der Einsendung beigelegt werden. In Ausnahmefällen kann der Auftrag per Fax an uns geschickt werden. Dieser wird im Labor ausgedruckt.

Labormedizinische Untersuchungen sind Leistungen, die nicht nur die Erstellung der Analyse beinhaltet, sondern auch die Interpretation und Bewertung der Analysenergebnisse. Soweit für die Fragestellung relevant, sollten auch vorhandene andernorts erstellte Vorbefunde (am besten in Kopie) mitgeteilt werden.

Angaben zu Material:

- Ankreuzen der beigelegten Materialart

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

- Anzahl der beigefügten Ausstriche bitte angeben
- Angabe Tag und Uhrzeit der Materialentnahme
- Angabe ob Erstdiagnose oder Verlauf
- Studienbezeichnung und Studiennummer wenn vorhanden
- Auswahl der angeforderten Untersuchungen (Zytomorphologie, Chromosomenanalyse, FISH, Molekulargenetik, Immunphänotypisierung)

Angaben über den Patienten:

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

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 zu 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

Für die Patientenversorgung ist es ggf. erforderlich Rücksprache mit den Einsendern zu halten. Dies dient dann die Anforderung des Einsenders zu klären bzw. offene Punkte auf dem Untersuchungsauftrag zu klären. Die Ergebnisse der Absprachen werden auf dem Untersuchungsauftrag bzw. in der Datenbank dokumentiert.

7.1.2 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

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

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 anzuwählen. 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 Verlaufsdiagnostik (MRD)“ der vorbekannte molekulare Marker zur molekularen Quantifizierung im Verlauf ausgewählt werden.

7.1.3 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.

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-Verlaufsdiagnostik 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

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

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

7.2 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.

7.3 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.

7.3.1 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.

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!

Wenn das Einholen der Einwilligung in Notfallsituationen nicht möglich ist, darf das Labor notwendige Untersuchungen durchführen, vorausgesetzt sie liegen im Interesse des Patienten.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

8 Analysendauer

8.1 Zytomorphologie

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

8.2 Zytogenetik

8.2.1 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.

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

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

8.3 Immunphänotypisierung

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

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

8.4 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

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

- Schnelldiagnostik 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

8.5 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,
- 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 Probenentnahme 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 Untersuchungsmaterialentnahme als Fehlerquelle

- Einflussgrößen

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

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

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 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.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

8.5.1 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.

8.5.2 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.

8.5.3 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.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

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.“

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

8.5.3.2 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.

8.6 Beschreibung der Risikoanalysen zum Restrisiko

In unserem Labor werden Qualität und somit auch die Analysen von Risiken in allen Bereichen sehr ernst genommen. Trotz aller vorgenommenen Risikominderungen (technisch, baulich, wissenschaftlich) bleiben oft vertretbare Restrisiken bestehen.

9 Leistungsverzeichnis

Siehe FB-PÄ 07 [Leistungsverzeichnis](#).

10 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).

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

10.1 Integrität der Probe

Wir möchte in Vorfeld darauf hinweisen, dass unsere Vorgaben zum Verpacken und Versand der Proben genau eingehalten werden.

Werden die Proben durch unsachgemäßen Transport beschädigt, werden wir

- 1) Transport in der Rohrpost, die Proben wieder auf die entsprechende Station zurückschicken
- 2) Mit den externen Einsendern Rücksprache zum weiteren Vorgehen nehmen

Zu diesen Vorfällen muss ein Fehlerprotokoll erstellt werden und ergriffene Maßnahmen gemäß unserer QM Vorgaben nachverfolgt werden.

10.2 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 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).

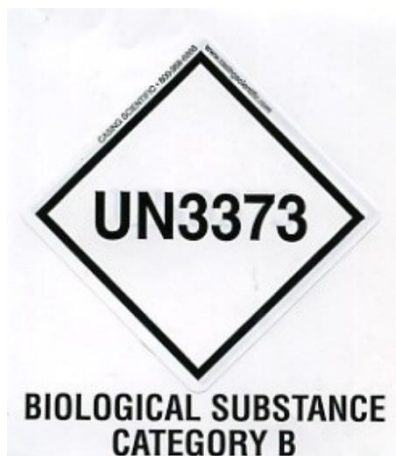


Abbildung 1: UN-Nummer 3373 gilt für: Biologische Stoffe, Kategorie B (Ein ansteckungsgefährlicher Stoff, der den Kriterien für eine Aufnahme in Kategorie A nicht entspricht)

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02



Abbildung 2: (A) Beispiel für eine Primärverpackung

(B) Beispiel für eine Sekundärverpackung



Abbildung 3: Beispiel für die Außenverpackung P650 light

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 4: Beispiel für die Außenverpackung P650

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

10.3 Kennzeichnung und Dokumentation

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

10.4 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.

11 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.

11.1 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.

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

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.

11.2 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).

11.3 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.

11.4 Beratungsleistungen

Wir bieten unseren Einsendern eine offene, interdisziplinäre Kooperation an. Die Ärzte und die zuständigen Mitarbeiter informieren und beraten Ärzte und Pflegepersonal umfassend in Bezug auf Indikationsstellung, Präanalytik und Befundinterpretation von Laboruntersuchungen. Dazu gehören auch z.B. Beratungen über die Auswahl der Untersuchungen einschließlich der Häufigkeit ihrer Wiederholungen, die erforderliche Art der Probe und ggf. eine Interpretation der Untersuchungsergebnisse.

Die Mitarbeiter stehen während der Dienstzeiten für Auskünfte zu Untersuchungsspektrum, Abnahmebedingungen, etc. zur Verfügung.

12 Qualitätssicherung im Labor

12.1 Interne Qualitätssicherung

Die interne Qualitätssicherung beinhaltet

- Umfangreiche Fort- und Weiterbildung der Mitarbeitenden
- Einsatz geeigneter analytischer Verfahren nach Validierung bzw. Verifizierung

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

- Ausführliche Dokumentation aller Laborprozesse
- Einsatz interner Qualitätskontrollen
- Überwachung aller analytischen Geräte durch Wartung, Kalibrierung und sorgfältige Qualifizierung
- Durchführung von internen Audits zur Selbstkontrolle
- Ständige Verbesserung unserer Prozesse
- Im Labor wurde ein umfassendes Risikomanagementsystem implementiert, das darauf abzielt, fortlaufend potenzielle Risiken zu identifizieren und somit möglichen Schaden von den Patienten abzuwenden. Trotz aller von uns ergriffenen Maßnahmen bleibt jedoch immer ein Restrisiko bestehen. Auf Anfragen informieren wir Sie gerne über individuelle verbleibende Restrisiken.

12.2 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)
 - BCR-ABL1 Kinase Domain Variant (Mutation) Status (Accredited)
 - BCR-ABL1 Major Quantification (Accredited)
 - BCR-ABL1 Minor Quantification (Accredited)
 - FLT-3 Mutation Status (Accredited)
 - Lymphoid Gene Panels (Not Accredited)
 - Measurable Residual Disease for AML by Molecular Methods (Not Accredited)
 - Myeloid Gene Panels (Not Accredited)
 - Myeloproliferative Neoplasms Diagnostic Testing (Accredited)
 - NPM1 Mutation Status (Accredited)
 - Post-Stem Cell Transplant Chimerism Monitoring (Accredited)

Handbuch zur Primärprobenentnahme

VA-PÄ 02

Weiter hat das Labor für verschiedene Analyten Laborvergleiche mit dem Labor für molekulare Hämatologie und Onkologie der Uniklinik Köln, Prof. Dr. Kreuzer und dem Münchener Leukämielabor MLL aufgebaut.

13 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.

14 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>