1. Probenmaterial

Materialgewinnung durch:

- Knochenmark-Punktion*
- Blutentnahme*
- Liquorpunktion: nativ ohne Antikoagulans
- Pleuraerguss/Aszites: nativ ohne Antikoagulans
- Stanzbiopsien/Gewebebiopsien/Lymphknoten: nur NaCl 0,9 % mit Heparin (500 I.E./ml), kein Formalin
- Mundschleimhautabstrich/Nagelmaterial: siehe Infoblatt Homepage unter Downloads/Einsendemodalitäten: https://www.mll.com/Downloads_MLL/Informationsblatt_Mundschleimhautabstrich_Nagelmaterial.pdf
- Leukapheresat (Stammzellapheresate, Glaskörperaspirat)
- Paraffinblock/-schnitte (Nur wenige Analysen können mit DNA aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem (FFPE) Material durchgeführt werden)
- DNA (Transport gekühlt)
- cDNA (Transport gekühlt)
- RNA (Transport auf Trockeneis)
- Kryokonservierte Zellen

2. Notwendige Probenmenge:

Je nach Untersuchungsmethode werden unterschiedliche Probenmengen benötigt:

- Chromosomenanalyse: möglichst 5-10 ml Knochenmark oder ggf. peripheres Blut bei V. a. CLL

- FISH 2-3 ml Knochenmark oder peripheres Blut sind bei normaler Zellularität ausreichend; alternativ können bereits angefertigte, nicht fixierte, ungefärbte Ausstriche untersucht werden
- Zytomorphologie: je 6-8 ungefärbte Knochenmark- und Blutausstriche, alternativ Flüssigmaterial für selbst anzufertigende Ausstriche
- Molekulargenetik: möglichst 5-10 ml Knochenmark / peripheres Blut / andere Proben nach Rücksprache, 15-20 ml bei Verlaufsuntersuchungen im peripheren Blut
- Immunphänotypisierung: möglichst 5-10 ml Knochenmark/peripheres Blut, 3-5 ml Liquor / Pleura / Aszites

Ein Gesamtvolumen von 10 ml Knochenmark ist ausreichend um alle o.g. Untersuchungen durchzuführen.

- Labormedizin Hämoglobin-Elektrophorese und maschinelles Blutbild: 3 ml peripheres Blut (EDTA)
- Labormedizin Klinische Chemie: 7,5 ml peripheres Blut (Serum)

3. Verarbeitung der Proben

3.1 Erforderliche Antikoagulanzien

Je nach Untersuchungsmethode werden bestimmte Antikoagulanzien benötigt:

- Chromosomenanalyse: Heparin; EDTA und Citrat sind nicht geeignet
- FISH: EDTA, Heparin oder Citrat
- Zytomorphologie: EDTA oder Citrat; Heparin ist nicht geeignet
- Molekulargenetik / Immunphänotypisierung: EDTA, Heparin oder Citrat
- Labormedizin: Hämoglobin-Elektrophorese und maschinelles Blutbild: EDTA
- Labormedizin Klinische Chemie: Serum – kein Antikoagulans

3.2 Material in Behälter ohne Antikoagulans abfüllen

Knochenmark/Peripheres Blut: Hinzugabe eines Antikoagulans: Heparin (500 I.E./ml), EDTA, Citrat

KM-Stanzen/Stanzbiopsie (bei punctio sicca): für die Chromosomenanalyse und Molekulargenetik kein Formalin, sondern nur NaCl 0,9% mit Heparin (500 I.E./ml)

Andere Materialien: Liquor/Pleuraerguss/Aszites: nativ ohne Antikoagulans

3.3 Kennzeichnung der Röhrchen

Beschriftung des Röhrchens mit Nachname, Vorname, Geburtsdatum des Patienten sowie Entnahmedatum

3.4 Bestellung der EDTA-/Heparin-/Serum-Röhrchen

Die mit den benötigten Antikoagulanzien versetzten Röhrchen können Sie über Ihr Routinelabor, mit dem Sie zusammenarbeiten, kostenfrei bestellen.

Die Kosten für diese Monovetten laufen unter „Praxisbedarf“ und werden von der AOK Bayern übernommen.

3.5 Voraussetzungen für eingeschickte DNA

Wir empfehlen, die DNA unverdünnt zu verschicken. Die Konzentration sollte 20-25 ng/µl nicht unterschreiten. Bitte geben Sie die Konzentration der DNA, das Primärmaterial (ggf. Fixierung) und wenn möglich auch die Messmethode an. Die Extraktion der DNA sollte mittels bewährter und etablierter Methoden erfolgen.

Im Allgemeinen wird für die Sequenzierungen mehrerer Gene 1 µg DNA benötigt. Es können z. B. 50 µl mit 20 ng/µl geschickt werden. Die Analyse einzelner Hotspots (z. B. *FLT3*-TKD) oder unseres MPN Panels (*JAK2*, *CALR* und *MPL*) kann mit 600 ng DNA durchgeführt werden.

3.6 Abweisekriterien für Proben

Immunphänotypisierung:

Für die Untersuchung auf Sphärozytose und des Immunstatus darf das Material nicht älter als 48 Stunden sein, da ansonsten ein korrektes Ergebnis nicht mehr gewährleistet werden kann. Bei Einsendungen, die eine größere Zeitspanne aufweisen, wird durch die berechtigten Wissenschaftler neues Material beim jeweiligen Einsender angefordert.

Molekulargenetik:

Für die beiden Analysen *TPSAB1* und MLPA (Hämoglobinopathien) eignet sich als Untersuchungsmaterial nur peripheres Blut mit dem Antikoagulanz EDTA oder DNA. Einsendungen, die Knochenmark oder mit Heparin versetztes Blut enthalten, werden nicht analysiert.

Für Keimbahnanalysen werden nur Mundschleimhautabstriche bzw. Nagelmaterial angenommen. Andere Untersuchungsmaterialien (z. B. Augenbrauenhaare) werden nicht analysiert.

Bei abgewiesenen Proben fordert der berechtigte Wissenschaftler neues Material beim jeweiligen Einsender an.

Labormedizin:

Für die Blutbild Analyse und HB Elektrophorese eignet sich EDTA Blut. Geronnenes EDTA Blut, oder anderen Antikoagulanzien müssen abgewiesen und erneut beim Einsender angefordert werden.

Für die Analyse des Eisenstatus wird Serum benötigt. Andere anderen Antikoagulanzien müssen abgewiesen und erneut beim Einsender angefordert werden.

4. Ausfüllen des Untersuchungsauftrags

Angaben zu Material und Untersuchung:

- Ankreuzen des beigefügten Materials (Knochenmark, peripheres Blut, anderes Material)
- Angabe der Anzahl beigefügter Ausstriche (jeweils für Knochenmark und peripheres Blut)
- Angabe des Datums und der Uhrzeit der Materialentnahme
- Kreuz bei Erstdiagnose oder Verlauf
- Angabe der Studie und der Studiennummer (falls vorhanden)
- Kreuz bei den gewünschten Untersuchungsmethoden (Zytomorphologie, Immunphänotypisierung, Chromosomenanalyse, FISH, Molekulargenetik, Labormedizin)

Ausfüllen der Patientendaten:

- Nachname, Vorname, Geburtsdatum, Geschlecht, Adresse, Krankenversicherung (ggf. Etikett)

Ausfüllen der Labordaten:

- Zahl der Leukozyten, Hämoglobinwert, Zahl der Thrombozyten, Angabe des Differentialblutbildes (falls vorhanden), Angabe weiterer pathologischer Befunde (falls vorhanden)

Angabe krankheitsspezifischer Daten:

- Diagnose/Verdachtsdiagnose
- Therapieverlauf (z. B. Angabe über bisherige Therapeutika, Knochenmarktransplantationen mit Angabe des Geschlechts des Spenders, Chemotherapien)

Angaben zum Einsender:

- Identitätsnachweis einsendende/r Arzt/Ärztin, Institution (Name, Telefonnummer, Faxnummer, Stempel)

Weitere Angaben:

- auf den darauf folgenden Seiten des Anforderungsbogens können die gewünschten Untersuchungsmethoden genauer spezifiziert werden

Ausfüllen der Einverständniserklärung:

- Angabe des Datums
- Unterschrift des Patienten
- Ausfüllen der Patientendaten (Nachname, Vorname, Geburtsdatum, vollständige Adresse)

Das Probenmaterial ist zu adressieren an:

MLL MVZ GmbH
Postfach 20 14 53
80014 München

Für Kurierdienste:

MLL MVZ GmbH
Max-Lebsche-Platz 31
81377 München

5. Verpackung, Kennzeichnung und Transport des Probenmaterials

5.1 Verpackung

Bei den Proben, die ins Labor eingesandt werden, handelt es sich in der Regel um „freigestellte Proben“ (nach Absatz 2.2.62.1.5.6. ADR handelt es sich um Proben, bei denen „eine minimale Wahrscheinlichkeit besteht, dass sie Krankheitserreger enthalten.“)

Verpackungen für medizinische Untersuchungsmaterialien müssen grundsätzlich so beschaffen sein, dass sie allen üblicherweise beim Transport auftretenden Belastungen standhalten und jegliches Freisetzen des Inhalts verhindert wird.

- Verpackungen für freigestellte Patientenproben müssen aus drei Bestandteilen bestehen (zusammengesetzte Verpackung):
    a) Einem wasserdichten Primärgefäß (z. B. Monovette)
    b) Einer wasserdichten Sekundärverpackung
    c) Einer ausreichend festen Außenverpackung (mindestens eine Oberfläche mit Abmessungen von 100 x 100 mm)

Die Sekundärverpackungen sind mit geeignetem Polstermaterial in die Außenverpackung einzusetzen. Bei flüssigen Stoffen muss zusätzlich zwischen Primär- und Sekundärverpackung ausreichend absorbierendes Material eingesetzt werden. Diese Verpackung entspricht bis auf einige Erleichterungen der P650 und wird daher oft als „P650 light“ bezeichnet.

- Verpackungen der Norm P650 für infektiöse Patientenproben und Kulturen der Kategorie B (UN-Nr. 3373)

Diese Verpackungen 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 95kPa standhalten. Ferner muss das gesamte Versandstück in der Lage sein, einen Falltest von 1,2 m Höhe unbeschadet zu überstehen.
Entsprechende Transportmaterialien können bei uns angefordert werden.

5.2 Kennzeichnung und Dokumentation

Freigestellte Proben vom Menschen sind neben der Angabe von Absender und Empfänger als „Freigestellte medizinische Proben“ zu kennzeichnen.

5.3 Transport und Postversand

Die Versanddauer sollte nicht mehr als 24 Stunden betragen. Dies wird durch einen 24h-Express-Service (z. B. DHL, UPS, TNT, GO) oder einen anderen Kurierdienst gewährleistet.
Bei Versand am Freitag sollte darauf geachtet werden, dass die Samstagszustellung angekreuzt wird. Eine Annahme der Proben am Sonntag ist nur mit vorheriger Absprache möglich. Bitte beachten Sie die für die jeweiligen Transportunternehmen unterschiedlichen Versandmodalitäten. Bitte rufen Sie uns hierzu gerne unter der 089/990170 an.

Bei Versand vor Feiertagen sollte darauf geachtet werden, dass Feiertagszustellung angekreuzt ist (Achtung: Feiertagszustellung nicht bei allen Dienstleistern möglich). Bitte beachten Sie hier insbesondere die nicht bundeseinheitlichen Feiertage: 06. Januar Heilige drei Könige, zweiter Donnerstag nach Pfingsten Fronleichnam, 15. August Mariä Himmelfahrt, 01. November Allerheiligen.

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

6. Entnahme von KM und PB

6.1 Entnahme von venösem peripherem Blut

Die benötigten Entnahmegefäße und Kanülen werden bereitgelegt und die Entnahmegefäße vor der Entnahme mit Vor- und Nachnamen sowie Geburtsdatum beschriftet. Der Patient sitzt und legt seinen Arm ab, der Stauschlauch wird angelegt.

Mit Desinfektionsspray wird die zu punktierende Stelle desinfiziert. Vor der Punktion etwa 30 Sekunden warten. Die Vene wird mit der Kanüle punktiert, das Entnahmegefäß wird angesteckt und das Blut aspiriert, dann wird der Stauschlauch geöffnet. Das Entnahmegefäß wird nach Beendigung der Blutentnahme wieder entfernt und anschließend die Nadel (bei gleichzeitigem Druck mit Zellstofftupfern auf die Punktionsstelle) gezogen. Die Nadel wird sofort in einem stichfesten Kanülenabwurfbehälter entsorgt. Die Tupfer werden gefaltet, entlang der punktierten Vene aufgelegt und mit einem Pflasterstreifen unter Zug befestigt. Der Patient wird dazu angehalten, noch mindestens drei Minuten fest mit zwei Fingern auf die Blutentnahmestelle zu drücken und nicht den Arm anzuwinkeln.

6.2 Knochenmarkbiopsie und -Aspiration

Die Entnahme der Proben erfolgt vorzugsweise am hinteren Beckenkamm (Spina iliaca posterior superior). Die ehemalige Sternalnadel (Klima-Rosegger-Nadel) (am Becken ohne den Abstandshalter zu verwenden) und eine Histologienadel (sog. Jamshidi-Nadel) sind zur Punktion zu verwenden.

6.2.1 Knochenmarkbiopsie

Zur Gewinnung artefaktfreien Gewebes sollte die Knochenmarkbiopsie vor der Aspiration durchgeführt werden. In Bauchlage wird nach gründlicher Desinfektion und steriler Abdeckung die Haut bis zum Periost der Spina iliaca posterior superior mit mindestens 10 ml Ultracain anästhesiert. Der Zeitraum bis zur befriedigenden Anästhesie beträgt mindestens 5 Minuten. Bevorzugt wird eine Nadelweite von 8 Gauge, bei jungen Patienten mit kräftigem Knochen hat sich die 11 Gauge-Nadel besonders bewährt. Bei besonders adipösen Patienten steht auch eine längere Nadel zur Verfügung. Die Nadel wird auf die Mitte des hinteren Beckenkammes aufgesetzt und nach Entfernung des Mandrins durch die Kortikalis in Richtung auf die zumeist gut tastbare Spina iliaca anterior hineingeschnitten. Eine Biopsielänge bis zu 4 cm ist möglich und erlaubt eine repräsentative Beurteilung des Knochenmarks. Eine große Biopsie erlaubt zudem ein leichteres “Abdrehen” und besseres Haften des gestanzten

Knochenmark-Zylinders in der Hohlnadel. Nach Gewinnung des Zylinders können davon ggf. Abrollpräparate angefertigt werden. Je nach der vorgesehenen Verwendung erfolgt Aufnahme der Biopsie in mit Heparin versetzte physiologisch Kochsalzlösung oder ihre Fixation. Die Nadel wird nach Beendigung in einem stichfesten Kanülenabwurfbehälter entsorgt.

6.2.2 Knochenmarkaspiration

Nach der Biopsiegewinnung erfolgt die Aspiration des Knochenmarks. Verwendet werden zumeist Punktionsnadeln nach Klima und Rosegger ohne Arretierung. Auch hier sollten Einmalnadeln wegen des schärferen Schliffs und aus hygienischen Gründen verwendet werden. Man punktiert das Knochenmark durch die bereits erfolgte Hautinzision, ungefähr 1 cm entfernt von der Biopsiestelle und in schrägem Winkel zur Biopsierichtung. Vor dem Aspirieren macht man den Patienten darauf aufmerksam, dass ein kurzzeitiger Schmerz auftreten wird, der auch durch sorgfältige Lokalanästhesie nicht verhindert werden kann. Man aspiriert kurz und kräftig mit einer 10 ml-Spritze bis zum vorgesehenen Volumen. Entnimmt man alle Proben von einer Stelle, so können die letzten Aspirate durch zunehmende Blutverdünnung eine andere Zellzusammensetzung als das erste Aspirat aufweisen. Bei unbefriedigender Aspiration muss die Lage der Punktionsnadel durch Drehen oder durch nochmaliges Punktieren verändert werden. Bei Punctio sicca hilft häufig ein Drehen der Nadel im Knochen unter weiterer Aspiration doch noch zur erfolgreichen Materialgewinnung. Die Nadel wird nach Beendigung in einem stichfesten Kanülenabwurfbehälter entsorgt. Bei weiter erfolgloser Punktion kann die andere Seite zusätzlich oder der vordere Beckenkamm nach entsprechender Anästhesie punktiert werden.

Nach Anlegen eines Heftpflasterverbandes wird die Punktionsstelle durch Liegen auf einem Sandsack komprimiert. Frühestens 30 Minuten später wird die Stelle auf eine Nachblutung hin kontrolliert.