



Präanalytik bei der Anforderung molekulargenetischer Untersuchungen im ZIMCL

Hintergrund und Bedeutung

Die Bedeutung wie auch das Spektrum molekulargenetischer Analysen für Diagnostik, Prognoseabschätzung, Risikostratifizierung, Verlaufskontrolle und Therapieüberwachung hat in den letzten Jahren enorm zugenommen. Da insbesondere bei quantitativen Verfahren eine geringste Anzahl von spezifischen DNA- bzw. RNA-Molekülen detektiert werden soll, ist die Einhaltung einer optimalen Präanalytik für eine korrekte Analyse essentiell.

Insbesondere die aus dem Probenmaterial isolierte RNA ist ein relativ instabiles Molekül. In der Zelle wird RNA ständig aufgebaut und mit Hilfe der Ribonukleasen nach der Translation wieder zerlegt. Die schnelle Degradierung der RNA durch ubiquitär vorhandene RNAsen (RNA-abbauende Enzyme) wird durch inadäquate Präanalytik potenziert. Nur durch sorgsame Probengewinnung, adäquaten Probentransport und schonende Probenbearbeitung im Rahmen der Analyse kann die Intaktheit der zu untersuchenden Genabschnitte (Ziel- bzw. Targetsequenzen) in DNA/RNA sichergestellt werden.

Alle molekulargenetischen Untersuchungen sind mehrstufige Verfahren und somit – insbesondere RNA-basierte Analysen – zeitaufwändig, arbeits- und kostenintensiv. Daher ist das Arbeiten mit einem möglichst optimalen Probenausgangsmaterial -wie für Laboranalysen generell- für alle molekulargenetischen Untersuchungen unbedingt erforderlich.

Gemeinsam für eine optimale Ergebnisqualität

UNSERE AUFGABEN UND MÖGLICHKEITEN ALS LABOR: Bei Probeneingang im ZIMCL kann bis auf die eingesandte Probenmenge, die Temperatur bei Eintreffen und visuelle Beurteilung auf das Vorliegen von Gerinnseln die Einhaltung der präanalytischen Vorgaben nur sehr eingeschränkt überprüft werden. Probengewinnung, Standzeiten und Lagerungstemperatur nach Gewinnung, Mischen unterschiedlicher Materialien (z.B. EDTA- mit Heparinblut, etc.) beeinflussen das Analyseergebnis in großem Ausmaß und können von uns nicht direkt beurteilt werden.

Wir können lediglich durch gut durchdachte und in den Analysenablauf stufenartig eingebaute Qualitätskontrollschritte die Einhaltung der präanalytischen Vorgaben indirekt und retrospektiv überprüfen. Falls diese, für jedes eingesandte Material durchgeführten Qualitätskontrollen den Hinweis liefern, dass die erzielten/erzielbaren Resultate letztlich in fehlerhafte Befunde münden (z.B. bei qualitativen Methoden in Rahmen der Leukämiediagnostik die Nichterfassung von Genfusionen, bei quantitativen Methoden die Unterschätzung der minimalen Resterkrankung durch Verlust von Zielsequenzen in DNA/RNA) behalten wir uns die Zurückhaltung von Befunden und den Hinweis auf eine erforderliche Neueinsendung auf Grund mangelhafter Präanalytik vor. Gemäß Akkreditierung nach EN-ISO 15189 müssen wir die Präanalytik unseren Zuweisern nicht nur vorgeben, sondern sind bei Nichtbeachtung dieser Vorgaben auch zur Zurückweisung verpflichtet.

Zum verbesserten Verständnis finden Sie unseren Analysenworkflow mit den integrierten Qualitätskontrollschritten auf Seite 4 schematisch dargestellt.

IHRE AUFGABEN UND VERANTWORTUNGEN ALS ZUWEISER: Da die Probengewinnung, die Lagerung (Temperatur, Zeit), der Versand und auch die Angaben zur eingesandten Probe in Ihren Händen liegt, ist bei allen von Ihnen im ZIMCL angeforderten molekularbiologischen Analysen die Beachtung und strikte Einhaltung folgender Punkte notwendig (Details finden Sie auf den Folgeseiten):

- **Ausreichendes Probenvolumen (v.a. bei hämato-onkologischen Parametern)**
- **Probenmaterial gut durchmischen (Knochenmarkaspirate!)**
- **Keine Zwischenlagerung im Sonnenlicht oder anderen warmen Orten (Heizung)**
- **Transportdauer < 24 Stunden**
- **Eindeutige Angaben zum Material (PB,KM,etc), Beschriftung, Kontaktdaten**
- **Ggf. Einverständniserklärung des Patienten mitschicken (betrifft einzelne Analysen)**

Bei Einhaltung der obgenannten Punkte kann eine bestmögliche Präanalytik und damit Aussagekraft der angeforderten Untersuchungen erreicht werden. Inadäquate Präanalytik wird trotz der stufenartig eingebauten Qualitätskontrollschritte in einzelnen Fällen nicht aufgedeckt werden. Dies kann letztlich zu Fehlbefunden führen, für welche wir selbstverständlich keinerlei Verantwortung übernehmen können. **Bei Nichterfüllung der vom ZIMCL und in Guidelines zahlreicher Fachgesellschaften festgelegten Vorgaben und der somit eingeschränkten Qualität des Untersuchungsmaterials kann eine wiederholte Materialgewinnung und Neueinsendung erforderlich werden.**

Wir dürfen Sie darüber informieren, dass das ZIMCL zur kontinuierlichen externen Qualitätskontrolle aller molekularen Analysen regelmäßig bei folgenden Organisationen an Ringversuchsprogrammen teilnimmt: RfB, INSTAND, UKNEQAS, RQAP, ÖQUASTA. Daneben erfolgen regelmäßig Vergleichsanalysen mit den folgenden Laboratorien: AKH Wien – Klinisches Institut für Labormedizin, Universitätsklinikum Bonn – Labor für experimentelle Hämatologie, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg.

Wir stehen für Rückfragen jederzeit gerne zur Verfügung, danken für die Zuweisung und die Zusammenarbeit.


Dr. Margit Dlaska


Dr. Lorin Loacker


Univ. Doz. Dr. Günter Weigel


Univ. Prof. Dr. Andrea Griesmacher

Innsbruck, im September 2014

⇒⇒⇒

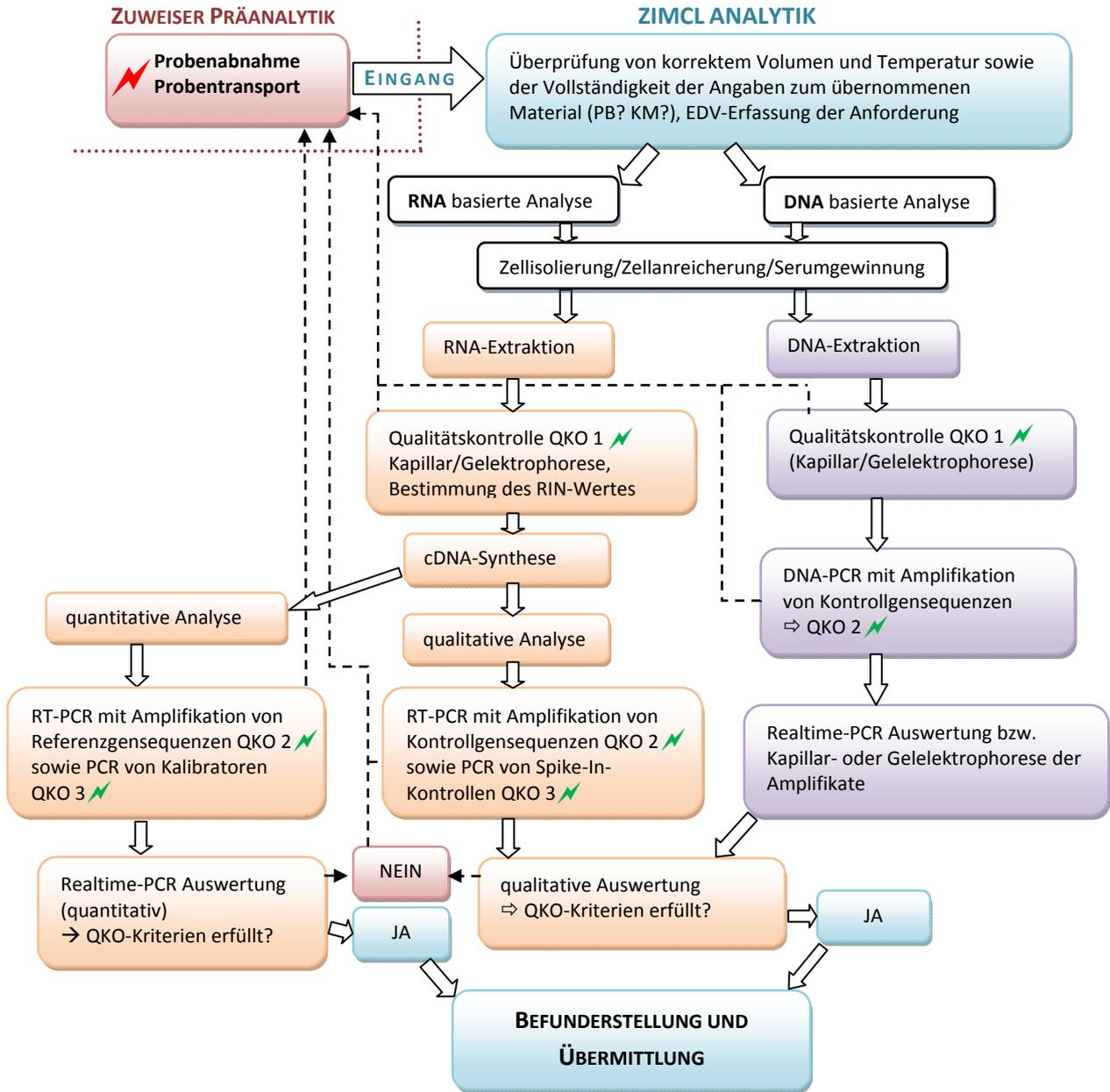
Detailinformationen

- **Ausreichendes Probenvolumen**
Für molekulare Untersuchungen von somatischen Veränderungen (zB Leukämie-, Lymphom, MDS, MPS, MRD- und prognostische Untersuchungen) werden prinzipiell ca. 10ml EDTA Blut benötigt (Tabelle s.u.). Für pharmakogenetische und hereditäre Analysen sind 3ml EDTA Blut ausreichend. Für infektiologische PCR Untersuchungen werden 5ml Nativblut bzw. 3ml Serum benötigt.
Bei geringer Leukozytenzahl (z.B. nach KMT, oftmals bei MDS, Haarzelleukämie) kann ein größeres Volumen erforderlich sein, um die für die Analyse erforderliche Zellzahl und damit eine ausreichende / optimale Sensitivität der Methode zu erzielen.
- Gute **Durchmischung des Probenmaterials** (5x mal Überkopf-Mischen) - insbesondere bei Einsendung von Knochenmark, da eine Gerinnselbildung zu stark reduzierten Zellausbeuten führt.
- **Transportdauer: Diese soll 24 Stunden nicht übersteigen**
Bei **internen** Anforderungen: **Unmittelbarer Versand** der Probe ins ZIMCL, da – wie ausgeführt – die enthaltene RNA einem raschen Abbau unterliegt.
Bei **externen** Anforderung: Probe sofort **auf 2-8°C kühlen, schnellstmöglich** und gekühlt (**Coolpacks**; keine Freezbags, da hier Proben anfrieren und hämolysieren können!) **versenden**. Abnahme ggf. nicht vor dem Wochenende planen, um einen verlängerten Transportweg übers Wochenende zu verhindern. Achtung: Proben **niemals einfrieren**.
- Proben **keinesfalls im Sonnenlicht oder an anderen warmen Orten** (Heizkörper) zwischenlagern.
- Probengefäß **eindeutig beschriftet** einsenden (zweifelsfreie Patientenidentifikation)
- Am Anforderungsbeleg (Download via <http://zimcl.uki.at> unter *ZIMCL Downloads*) das **eingesandte Spezimen (EDTA, Knochenmark, Serum) sowie die (Verdachts)diagnose bzw. Fragestellung vermerken** (zur Sicherstellung, dass das Spezimen für das gewünschten Untersuchungsverfahren und die klinische Fragestellung adäquat ist).
- Angabe Ihrer **Kontaktdaten** (Name, DECT-Nummer, Telefonnummer mit Durchwahl) für mögliche Rücksprachen bei etwaigen Unklarheiten.
- Unterfertigte **Einverständniserklärung**: Nur erforderlich bei hereditären Analysen (zB Thrombophilie-, Zöliakie-, ApoE-Genotypisierung etc); bitte zuständigen Facharzt für die Befundübermittlung angeben.

Literatur

- Hughes et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):28-37.
- Baccarani et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013 Aug 8;122(6):872-84.
- Gökbuget, N. (Ed.). Recommendations of the European Working Group for Adult ALL. Uni-Med Verlag 2011.
- Pazzagli et al. SPIDIA-RNA: first external quality assessment for the pre-analytical phase of blood samples used for RNA based analyses. *Methods*. 2013 Jan;59(1):20-31.
- Imbeaud et al. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res*. 2005 Mar 30;33(6):e56.
- Staal et al. Consensus guidelines for microarray gene expression analyses in leukemia from three European leukemia networks. *Leukemia*. 2006 Aug;20(8):1385-92.
- Breit et al. Impact of pre-analytical handling on bone marrow mRNA gene expression. *Br J Haematol*. 2004 Jul;126(2):231-43.
- Wilfinger et al. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*. 1997 Mar;22(3):474-6, 478-81.
- Neumaier et al. Experiences with external quality assessment (EQA) in molecular diagnostics in clinical laboratories in Germany. Working Group of the German Societies for Clinical Chemistry (DGKC) and Laboratory Medicine (DGLM). *Clin Chem Lab Med*. 2000 Feb;38:161-3.
- Chen et al. Good Laboratory Practices for Molecular Genetic Testing for Heritable Diseases and Conditions. Recommendations and Reports. June 12, 2009 / 58(RR06);1-29
- Fleige et al. Einfluss der RNA-Integrität auf die quantitative real-time RT-PCR. *Laborwelt Nr. 5/2007*. ⇒⇒⇒

ANALYSEWORKFLOW im ZIMCL mit QUALITÄTSKONTROLL (QKO) STUFEN (✓)



⇒⇒⇒

Übersicht der im ZIMCL angebotenen Analysen mit Materialbedarf und Besonderheiten

Analyse	Mindest-Volumen / Material	DNA  RNA  Analyse	Besonderheit
BCR-ABL (quantitativ und qualitativ)	Mindestens 10ml EDTA-Blut 3-5ml EDTA/Heparin Knochenmark		Schnellstmöglicher (sofort) Versand, bis dahin kühlen
PML-RARA (quantitativ und qualitativ)	Mindestens 10ml EDTA-Blut 3-5ml EDTA/Heparin Knochenmark		Schnellstmöglicher (sofort) Versand, bis dahin kühlen
Akute-Leukämie-Abberationsscreening	10ml EDTA-Blut 3-5ml EDTA/Heparin Knochenmark		Schnellstmöglicher (sofort) Versand, bis dahin kühlen
Einzeltranslokationsnachweise qualitativ (RUNX1-RUNX1T1, inv(16), MLL-AFF1, TCF3-PBX1, ETV6-RUNX1, SIL-TAL1, ETV6-PDGFRB etc.)	10ml EDTA-Blut 3-5ml EDTA/Heparin Knochenmark		Schnellstmöglicher (sofort) Versand, bis dahin kühlen
NPM1 Mutation	5ml EDTA-Blut 3ml EDTA/Heparin Knochenmark		Schnellstmöglicher (sofort) Versand, bis dahin kühlen
Myeloproliferative Marker: JAK2, MPL, Calreticulin Mutation	10ml EDTA-Blut 3-5ml EDTA/Heparin Knochenmark	 	Schnellstmöglicher (sofort) Versand, bis dahin kühlen
bcl-1, bcl-2	5ml EDTA-Blut 3ml EDTA/Heparin Knochenmark		Eintreffen im ZIMCL innerhalb von 48h
NOTCH1, SF3B1, KIT D816V, BRAF V600E	5ml EDTA-Blut 3ml EDTA/Heparin Knochenmark		Eintreffen im ZIMCL innerhalb von 48h
Immunglobulin / T-Zellrezeptor-Rearrangement	10ml EDTA-Blut 3-5ml EDTA/Heparin Knochenmark		Eintreffen im ZIMCL innerhalb von 48h
Pharmakogenetische Untersuchungen (TPMT, DPD, Cyp P450, MDR, SLCO1B1)	3ml EDTA Blut		Eintreffen im ZIMCL innerhalb von 48h
Hereditäre Untersuchungen (Thrombophilie, Zöliakie, ApoE, HLA-B27, HFE, LCT etc)	3ml EDTA Blut		Einverständniserklärung erforderlich Eintreffen im ZIMCL innerhalb von 48h
Infektiologische molekulare Untersuchungen (HCV-, HEV-, HAV-, Malaria PCR etc)	5ml Nativblut	 	Eintreffen im ZIMCL innerhalb von 24h