

Einsendeinformationen Molekularpathologie - Präanalytik

Ziel:

Mit dem vorliegenden Leitfaden werden **allen Einsendern** Hinweise für den Versand von Primärproben und den **einsendenden Pathologen** Hinweise zur Vorbereitung von Proben mit dem Ziel molekularpathologischer Diagnostik gegeben.

Probenannahme:

Die Probenannahme erfolgt:

Montag – Freitag von 07:30 bis 18:00 Uhr oder nach vorheriger Absprache.

Generelle Hinweise zum Versand von Primärproben

Für auswertige Einsender stehen diverse Versandmaterialien (PaxGene-Röhrchen für Liquid Biopsies), Gefäße (mit 4%iger neutraler Formalinlösung) sowie Einsendescheine zur Verfügung.

Informationen für die einsendenden Patholog*innen

Für molekularpathologische Untersuchungen sollte nach Möglichkeit fertiges FFPE-Material (Blockform) eingeschickt werden. Von den Blöcken wird die zur Analyse notwendige Anzahl von Schnitten in erforderlicher Schnittdicke hergestellt.

Die Einsendung ungefärbter Nativschnitte zur Gewinnung von DNA oder Durchführung von FISH ist alternativ möglich, **jedoch nicht die bevorzugte Variante.**

Für die Einsendung von Blut zur T790M-Mutationsanalyse bei NSCLC verwenden Sie bitte die im Vorfeld vom Institut für Pathologie zur Verfügung gestellten PAXGene-Röhrchen zur Stabilisierung frei zirkulierender Tumor-DNA (*Vorgehensweise dabei wird weiter hinten im Leitfaden beschrieben*).

Notwendige Informationen auf dem Einsendeschein

In der Regel sind folgende Angaben auf dem Einsendeschein vollständig und gut lesbar auszufüllen:

- Vor- und Nachname, Geburtsdatum, Adresse des Patienten
- Krankenhaus, ggf. Station, andere Pathologie
- Absender (Adresse des einsendenden Arztes); Einsendedatum
- Untersuchungsmaterial/klinische Diagnose
- Ergebnisse histologischer Voruntersuchungen/Vorbefunde
- Klinische Fragestellung bzw. spezifischer Untersuchungsauftrag (s. Anforderungsbogen für molekularpathologische Diagnostik)
- Anatomischer Entnahmeort des Untersuchungsmaterials
- Besonderheiten (evtl. Bestrahlung des Tumors, Vorbehandlung des Materials, u.a.)

Diskrepanzen

Ist eine Diskrepanz zwischen Block und Einsendungsschein vorhanden, wird der Einsender darüber telefonisch durch das Sekretariat informiert und um Klärung des Sachverhaltes gebeten. Kann der Sachverhalt nicht geklärt werden, erfolgt keine Bearbeitung des eingesandten Materials, sondern eine Rücksendung desselben.

Ist nach Herstellung eines HE-Schnittes keine Korrelation zwischen Histologie und molekularpathologischer Fragestellung gegeben, erfolgt ebenfalls eine telefonische Klärung mit dem Einsender.

Gewebevorbehandlung / Hinweise zur Fixierung des Gewebematerials

Für nahezu alle molekularpathologischen Untersuchungen im Institut für Pathologie des UKD wird FFPE-Material verwendet. Die Formalin-Fixierung erfolgt mit 4%igen neutral gepufferten Formalin, je nach Art und Größe des Materials mindestens 6 Stunden und maximal 24 Stunden. Die vorschriftsgemäße Formalin-Fixierung des Gewebes ist unabdingbar für eine hohe Qualität der DNA, welche für nachfolgende molekularpathologische Untersuchungen benötigt wird. Dabei ist eine Überfixierung des Gewebes durch die entstehenden Schiffschen Basen genauso problematisch wie eine nicht ausreichende Fixierung.

Hinweise zur Entkalkung von Knochengewebe

Knochengewebe sollte in der Regel vor der Paraffin-Einbettung entkalkt werden. Der Entkalkungsprozess bzw. die dazu verwendeten Lösungen und Reagenzien haben Einfluss auf die molekularpathologische Untersuchung.

Welches der verschiedenen Entkalkungsmittel verwendet wird, entscheidet der Pathologe beim Zuschnitt.

Verfahren zur Entkalkung:

- Osteosoft: Entkalkungsdauer max. 24-72h
anschließend 1-2 min wässern
- Osteomoll: Entkalkungsdauer max. 8h
anschließend 1-2 min wässern
- 5% Salpetersäure: Entkalkungsdauer
max. 24-48h bei kompakten
max. 6-8h bei normalen Knochengewebe
anschließend 1-2 min wässern
- verdünnte Ameisensäure: Entkalkungsdauer ca. 1 Woche

Störfaktoren

Störfaktoren sind allgemeine Faktoren, die eine molekularpathologische Analyse beeinflussen oder verhindern können, wie z.B.:

- Überfixierung
- Entkalkungsprozess
- Nekrose des Gewebes / unzureichende oder zu späte Fixierung
- PCR-inhibierende Substanzen im Gewebe (z.B. Melanin, Hämoglobin, u.a.)
- Bestrahlung des Tumors

Hinweise zu Blutentnahme und Versand von Liquid Biopsies / zur Analyse von cfDNA

Blutentnahme:

- Entnahme von 10ml Blut nach CLSI H3-A6 (Standard-Venenpunktionsverfahren) mit einer Venofix Safety Kanüle G21 oder System für Blutkulturen
- Verwendung von: **PAXgene (blood ccfDNA tube)**, Fa. PreAnalytix bzw. über Qiagen
oder

Cell-Free DNA BCT Röhrchen, Fa. STRECK

- Patientenarm muss abwärts gerichtet sein, damit **kein Rückfluss** (da beide Röhrchen chemische Zusatzstoffe enthalten) entstehen kann
- Röhrchen aufrecht halten und vollständig befüllen
- Röhrchen mit Patientendaten beschriften
- Nach der Entnahme Röhrchen **unverzüglich 10mal über Kopf schwenken (invertieren)**
→ sonst ist keine Stabilität der Blutprobe gewährleistet!
- Blutproben sind anschließend stabil für max. 4 Tage **bei Raumtemperatur**



Versand:

- Röhrchen nicht einfrieren, können gut gesichert bei RT gelagert und versendet werden
- Vollblut sollte spätestens am 4. Tag zu Plasma verarbeitet werden (bitte bei Versendung mit einberechnen), Versendung der Proben am Freitag möglichst vermeiden
- Versand erfolgt mittels Bote oder in einem mit UN3373 gekennzeichneten Paket

Hinweise zu molekulargenetischen Untersuchungsmethoden

Nachweis und Verdünnungsgrenzen

Die Nachweis- und Verdünnungsgrenzen bei molekulargenetischen Analysen stehen in engem Zusammenhang mit der vorhandenen Materialmenge.

Unter der Nachweisgrenze versteht man den Anteil spezifischer DNA (mutierte DNA) in der eingesetzten Gesamt-DNA.

Die Verdünnungsgrenze ist die Menge an Probe, die benötigt wird, um eine Analyse (PCR und nachfolgende Sequenzierung) erfolgreich durchführen zu können. Die Verdünnungsgrenze ist sehr variabel und hängt u.a. von folgenden Faktoren ab:

- Art, Herkunft und Vorbehandlung der Proben
- Größe der Probe bzw. des Analyseareals
- Analysespezifische Variabilität
- Störfaktoren

Mutations-/ Methylierungs-/Erregeranalysen

Die Auswahl von Proben mit hohem relevantem Tumoranteil (50-80% eines Areals sollten Tumorzellen sein) tragen zum Gelingen der Analysen bei, da die zu analysierende Mutation heterogen sein kann und man davon ausgehen muss, dass nicht jede der zur Verfügung stehenden Tumorzellen die Mutation trägt.

Materialmenge

- Material für 2-3 Schnitte je 5µm mit genügend Tumormaterial
- Größe des Tumormaterials nach Möglichkeit ca. 0,5-1 cm²
- Tumoranteil nach Möglichkeit ca. 50-80%

FISH-Analysen

Zur FISH-Analyse werden bevorzugt durch die Mitarbeiter der Molekularpathologie selbst Schnitte von eingesandten Blöcken hergestellt. Dabei sind folgende Dinge zu beachten, die auch für die Zusendung von Leerschnitten gelten:

- Vorhandensein von ausreichend analysierbaren Zellen auf dem Schnitt (mind. 50 Tumorzellen pro Schnitt)
- Herstellung von mind. 3 OT à 2 Schnitte mit einer Schnittdicke von ca. 3-4 µm (HE zum Anzeichnen des Tumorareals, 2 Schnitte zur FISH-Analyse)
- Verwendung von Superfrost Objektträger zur FISH-Analyse

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. G. Baretton
Tel. 0351/458-18196 oder 0351/458-13018
Fax. 0351/458-5710



Universitätsklinikum
Carl Gustav Carus
DIE DRESDNER.



Ablehnung von Untersuchungsgut

Das zu bearbeitende Untersuchungsmaterial muss gewissen Anforderungen entsprechen, um eine erfolgreiche Analyse zu gewährleisten. In folgenden Situationen wird das Material nicht zur Analyse akzeptiert:

- weniger als 20 Tumorzellen vorhanden bei FISH-Anforderung
- weniger als 50 Tumorzellen vorhanden bei Mutationsanalyse
- kein Tumor vorhanden auf Block

Widerruf von Anforderungen

Patienten und anfordernde Ärzte können jederzeit den schon übermittelten Auftrag zur Analyse widerrufen. Bitte nutzen Sie hierfür die angegebenen Kontakte der Ansprechpartner*innen.

Übermittlung der Analyseergebnisse

Befundberichte werden in der Regel per Fax übermittelt, jedoch nur an bekannte Einsender und erst nach Freigabe des Befundes durch den zuständigen Arzt. Das Fax-Gerät des Empfängers muss an einem nicht-öffentlichen, gesicherten Umfeld stehen. Es erfolgt abschließend auf postalischen Weg ein Versand der erstellten Befunde in Papierform.

Befundberichte können unter der Befundhotline (0351/4582838) erfragt werden.

Befundberichte können auch auf elektronischem Wege übermittelt werden, jedoch nicht per E-Mail.

Voraussetzung ist eine gesicherte Verbindung an einen definierten Empfänger.

Technische Mitarbeiter (MTAs, Naturwissenschaftler) dürfen keine Befundberichte u. ä. übermitteln oder Auskünfte erteilen.

Ansprechpartner*innen

Prof. Dr. Daniela E. Aust	Tel.: 0351/458 3004	Daniela.Aust@uniklinikum-dresden.de
Dr. Silke Zeugner	Tel.: 0351/458 14415	Silke.Zeugner@uniklinikum-dresden.de

Notwendige Formulare

- Anforderungsbogen für molekularpathologische Diagnostik, Download möglich auf [Homepage Institut für Pathologie am UKD, Molekularpathologie](#)
- Überweisungsscheine mit Vermerk der gewünschten Analyse