onkopedia

onkopedia leitlinien

Hämatologische Diagnostik

Leitlinie

Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen

---

DGHO
DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR HÄMATOLOGIE UND MEDIZINISCHE ONKOLOGIE

ÖGHO
Österreichische Gesellschaft für Hämatologie & Medizinische Onkologie

Herausgeber

DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und
Medizinische Onkologie e.V.
Alexanderplatz 1
10178 Berlin

Geschäftsführender Vorsitzender: Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

Telefon: +49 (0)30 27 87 60 89 - 0
Telefax: +49 (0)30 27 87 60 89 - 18

info@dgho.de
www.dgho.de

Ansprechpartner

Prof. Dr. med. Bernhard Wörmann
Medizinischer Leiter

Quelle

www.onkopedia.com

Die Empfehlungen der DGHO für die Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen entbinden die verantwortliche Ärztin / den verantwortlichen Arzt nicht davon, notwendige Diagnostik, Indikationen, Kontraindikationen und Dosierungen im Einzelfall zu überprüfen! Die DGHO übernimmt für Empfehlungen keine Gewähr.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 3
2 Zytomorphologie 4
2.1 Indikationen 4
2.2 Methodischer Hintergrund 4
2.3 Präanalytik 4
2.4 Analytik 5
2.4.1 Peripheres Blut (Differenzialblutbild) 6
2.4.2 Knochenmark 7
2.5 Qualitätsstandards 7
3 Durchflusszytometrie 8
3.1 Indikationen 8
3.2 Methodischer Hintergrund 8
3.3 Präanalytik 8
3.4 Analytik 9
3.5 Qualitätsstandards 9
4 Zytogenetik 9
4.1 Indikationen 9
4.2 Methodischer Hintergrund 9
4.3 Präanalytik 10
4.4 Analytik 10
4.5 Qualitätsstandards 11
5 Molekulargenetik 12
5.1 Indikationen 12
5.2 Methodischer Hintergrund 12
5.3 Präanalytik 12
5.4 Analytik 13
5.5 Qualitätsstandards 14
6 Histopathologie (Knochenmark) 14
6.1 Indikationen 14
6.2 Methodischer Hintergrund 15
6.3 Präanalytik 15
6.4 Analytik 16
6.5 Qualitätsstandards 16
9 Weiterführende Literatur 16

15 Adressen der Autoren 17
16 Erklärung zu möglichen Interessenkonflikten 18

Hämatologische Diagnostik

Stand: August 2015

Autoren: Karl-Anton Kreuzer, Peter Bettelheim, Torsten Haferlach, Andreas Rosenwald

1 Einleitung

Eine akkurate Diagnose ist unabdingbare Voraussetzung für eine sachgerechte Therapieentscheidung in der Hämatologie. Hierzu zählt nicht nur die korrekte Feststellung der übergeordneten Entität nach der derzeit gültigen WHO-Klassifikation (2008), sondern auch eine möglichst genaue Subtypisierung. Denn auch letztere kann wiederum einen wichtigen Einfluss auf die Behandlungsstrategie nehmen.

Darüber hinaus muss insbesondere vor dem Einsatz zielgerichteter Therapien sichergestellt werden, dass die biologische Zielstruktur auf oder in den betreffenden Zellen vorhanden ist (z.B. CD20, CD30, CD52, *BCR-ABL1*, *JAK2* V617F, *PML-RARA*).

Ein weiteres sehr wichtiges Einsatzgebiet der hämatologischen Diagnostik ist es, Prognoseparameter für die einzelnen Erkrankungen zu liefern. So kann sich etwa die Behandlung innerhalb einer Entität erheblich auf Grund dieser Information ändern (z.B. *TP53*-Mutationen bei der chronischen lymphatischen Leukämie). Dies gilt nicht nur für die initiale Befunderhebung, sondern auch während des Krankheitsverlaufes, da mittlerweile eine Reihe von Mechanismen bekannt sind, die eine erworbene Therapieresistenz zur Folge haben (z.B. *BCR-ABL1*-Mutationen bei der chronischen myeloischen Leukämie).

Schließlich liefern insbesondere molekulare Nachweisverfahren wichtige Informationen zum Therapieansprechen und zur Remissionstiefe nach eingeleiteter Behandlung. Für kurative Behandlungskonzepte ist etwa der persistierende Nachweis einer minimalen Resterkrankung (minimal residual disease, MRD) sehr bedeutungsvoll. Mittlerweile konnte jedoch auch überzeugend gezeigt werden, dass ein gutes Therapieansprechen jenseits der mikroskopischen Diagnostik bei nicht-kurablen Erkrankungen ebenfalls mit der zu erwartenden Remissionsdauer korreliert.

Die nachfolgenden Ausführungen sollen den Anwendern der verschiedenen diagnostischen Verfahren die derzeit gültigen Standards darlegen und den behandelnden Kolleginnen und Kollegen die Möglichkeiten und Grenzen dieser Laborinformationen skizzieren.

2 Zytomorphologie

2.1 Indikationen

- Unklare Normabweichungen im maschinellen Blutbild
- Verdacht auf primäre Knochenmarkerkrankungen (Leukämien, Lymphome etc.)
- Remissionskontrollen hämatologischer Erkrankungen
- Verdacht auf neoplastische Infiltration nicht-hämatopoetischer Organe bzw. Kompartimente (Leptomeningealraum, Peritoneum usw.)

2.2 Methodischer Hintergrund

Die Zytomorphologie von peripherem Blut und Knochenmark ist eine schnelle und preiswerte Methode, um richtungsweisende diagnostische Informationen zu hämatologischen Erkrankungen zu erhalten. Insbesondere im Lichte neuerer teurerer Verfahren kommt ihr eine besondere Rolle bei der Indikationsstellung für weitergehende Analysen im Rahmen einer wirtschaftlichen Stufendiagnostik zu. Ferner eignet sie sich als rasche orientierende Untersuchung von Punktionsmaterialien. Die wichtigsten Kenndaten dieser Methode sind:

- Untersuchungsdauer: Die Untersuchungsdauer beträgt bei einer panoptischen Färbung ca. 15-30 Minuten. Bei Spezialfärbungen bzw. zytochemischen Färbungen richtet sich die Dauer der Untersuchung maßgeblich nach diesen.
- Vor- und Nachteile: Die Vorteile des Verfahrens bestehen in seiner praktisch ubiquitären Verfügbarkeit, raschen Durchführbarkeit und den geringen Kosten. Die hauptsächlichen Nachteile bestehen in der geringen Sensitivität (ca. 1:100) und der hohen Erfahrungsabhängigkeit vom Untersucher.

2.3 Präanalytik

Als Untersuchungsmaterial eignen sich peripheres Blut, Knochenmarkaspirat sowie flüssige Punktionsmaterialien (Liquor, Aszites, Pleuraflüssigkeit u.a.). Für alle Materialien gilt, dass sie im rasch präparierten Nativzustand sehr gut zu bewerten sind. Sie können jedoch auch mit dem Antikoagulanz Ethylendiamintetraacetat (EDTA) versetzt werden, was spätere Präparationen in vergleichbarer Qualität zulässt. EDTA- antikoaguliertes Material sollte innerhalb von 24 Stunden analysiert werden, dies gilt sowohl für das numerische Blutbild als auch für das Differenzialblutbild. Heparin ist als Antikoagulanz für zytomorphologische Untersuchung wegen Artefaktbildungen nicht geeignet.

Voraussetzung für eine aussagekräftige Untersuchung ist die Gewinnung von repräsentativem Material und eine fachgerechte Präparation. Bei allen Punktionen muss daher sichergestellt sein, dass das zu untersuchende Kompartiment getroffen wurde. Aus diesem Grunde sollte direkt das erste Aspirat für die zytomorpho-

logische Analytik gewonnen werden, damit es später einer visuellen Kontrolle im Mikroskop unterzogen werden kann.

Die Präparation des Materials kann unverzüglich am Nativmaterial oder später an antikoaguliertem Material erfolgen. Bei peripheren Blutausstrichen ist darauf zu achten, dass ein abnehmender Dickegradient auf dem Objektträger mit Ausbildung einer so genannten Ausstrichfahne entsteht. Knochenmarkpräparate werden unmittelbar nach Aspiration (innerhalb weniger Sekunden, da das Aspirat sehr schnell gerinnen kann) als Ausstrich- oder als sogenannte Quetschpräparate angefertigt. Hierbei ist darauf zu achten, dass genügend Knochenmarkbröckel auf die Objektträger gelangen. Bei frustraner Aspiration sollten versuchsweise Abrollpräparate von einer nativen Stanzbiopsie angefertigt werden. Prinzipiell ist es erstrebenswert, mindestens 5 Blut- und Knochenmarkpräparate zu erhalten. Andere Punktionsmaterialien sollten idealerweise rasch unpräpariert in das Labor gelangen, da sie dort häufig speziell aufgearbeitet werden (z.B. Zytozentrifugation). Im Zweifel ist Rücksprache mit dem beauftragten Labor zu halten.

2.4 Analytik

Die Präparate sollten mindestens 15 min lufttrocken, insbesondere auch vor einem eventuellen Versand. Obligat ist die Durchführung einer panoptischen Färbung (z.B. nach Pappenheim), welche eine gute Übersicht über die verschiedenen Zellfraktionen erlaubt. Alle weiteren Färbungen ergeben sich aus deren Bewertung, siehe Tabelle 1:

Tabelle 1: Zytomorphologie - Färbungen

Färbung	Indikation
Pappenheim-Färbung (Giemsa- & May-Grünwald-Färbung)	Übersichtsfärbung
Alpha-Naphtylacetatesterase-Reaktion (EST)	Nachweis monozytär differenzierter Zellen
Berliner-Blau-Reaktion	Nachweis von extrazellulärem (Markbröckel) und intrazellulärem (z.B. Sideroblasten) Eisen
Brillantkresylblau	Nachweis der Substantia granulofilamentosa in Retikulozyten
Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)	Nachweis von glykogenhaltigen Zellen (z.B. bei Erythroleukämie)
Peroxidase-Reaktion (POX)	Nachweis granulozytär differenzierter Zellen
Saure Phosphatase (SP)	Charakterisierung neoplastischer lymphatischer Zellen (z.B. T-ALL)

Die Untersuchung der fertigen Präparate erfolgt an einem qualitativ hochwertigen Lichtmikroskop. Die Objektivausstattung sollte eine Übersichtsvergrößerung (10x oder 20x), eine mittlere Vergrößerung (40x oder 63x) sowie eine hochauflösende Vergrößerung (100x) beinhalten. Der Untersuchungsgang beginnt mit einer Orientierung über die Qualität des Materials und einer quantitativen Analyse der Zellverteilung. Hierzu werden im peripheren Blutausstrich mindestens 100 kernhaltige Zellen (Differenzialblutbild) sowie die Erythrozytenmorphologie bewertet. Im Knochenmark werden mindestens 200 kernhaltige Zellen (Myelogramm) kategorisiert. Abweichungen hiervon, z.B. bei ausgeprägter hämatopoetischer Hypo-

plasie, sind zu dokumentieren. Mit Ausnahme des Liquors erfolgt die Analyse anderer Punktionsmaterialien nicht nach einem festgelegten Prinzip, sondern richtet sich in erster Linie nach der Fragestellung.

Neben der quantitativen Analyse sollte eine möglichst genaue Beschreibung normabweichender qualitativer Zellmerkmale erfolgen. Auch Ausschlussfeststellungen (z.B. kein Nachweis knochenmarkfremder Zellen) können für die abschließende Beurteilung hilfreich sein. Letztere sollte so konkret wie möglich formuliert werden und kann auch Verweise auf komplementäre diagnostische Methoden enthalten.

2.4.1 Peripheres Blut (Differenzialblutbild)

Die Klassifikation der kernhaltigen Zellen erfolgt mindestens in die folgenden Kategorien (mit exemplarischen Normbereichen), siehe Tabelle 2:

Tabelle 2: Zytomorphologie – Klassifikation und Verteilung kernhaltiger Zellen im peripheren Blut

	Normbereich	Dimension
Stabkernige neutrophile Granulozyten	3-5	%
Segmentkernige neutrophile Granulozyten	40-70	%
Eosinophile Granulozyten	2-4	%
Basophile Granulozyten	0-1	%
Monozyten	3-7	%
Lymphozyten	20-40	%

Nötigenfalls (z.B. reaktive oder pathologische Linksverschiebung) können folgende Kategorien hinzugefügt werden: Blasten, Promyelozyten, Myelozyten und Metamyelozyten. Weitere hämatopoetische Zellen wie z.B. Erythroblasten, Plasmazellen usw. werden separat quantifiziert.

Sogenannte Kernschatten sind der Lymphozytenfraktion zuzurechnen, können im Befundkommentar jedoch auch quantitativ (% der Leukozyten) oder semiquantitativ angegeben werden: wenige (+), einige (++) oder viele (+++).

Feststellungen zur Lymphozytenmorphologie (Reizformen, aktivierte Lymphozyten, LGL-Zellen, Mantelzellen usw.) sind i.d.R. wertender Natur und sollten daher im Befundkommentar getroffen werden. Versierte Untersucher können hier eine Einteilung in „typischer Lymphozyt“, „atypischer Lymphozyt, vermutlich reaktiv“ und „atypischer Lymphozyt, vermutlich neoplastisch“ vornehmen und eine quantitative (% der Leukozyten) oder semiquantitative Aussage hierzu treffen: wenige (+), einige (++) oder viele (+++).

Weitere qualitative Veränderungen der Leukozyten (z.B. toxische Granulationen, Pseudo-Pelger-Formen), Erythrozyten (z.B. Anisozytose, Poikilozytose, Polychromasie, Ruleaux-Formationen) oder Thrombozyten (z.B. Riesenthrombozyten) können ebenfalls semiquantitativ durch eine Einteilung in leicht (+), mittel (++) oder stark (+++) angegeben werden.

Der Anteil an Fragmentozyten wird in Prozent (%) oder Promille (‰) der Erythrozyten angegeben. Zur Ermittlung des Wertes sind mindestens 5 Gesichtsfelder einer 100er-Objektivvergrößerung (entspricht ca. 200 Erythrozyten/Gesichtsfeld) auszuzählen.

2.4.2 Knochenmark

Die Beurteilung der Knochenmarkpräparate sollte ebenfalls zunächst eine Aussage über den Zellgehalt beinhalten, sodann eine Quantifizierung der kernhaltigen Zellen (Myelogramm), die mindestens die folgenden Kategorien enthält (mit exemplarischen Normbereichen), siehe Tabelle 3:

Tabelle 3: Zytomorphologie – Klassifikation und Verteilung kernhaltiger Zellen im Knochenmark

	Normbereich	Dimension
Myeloblasten	0-3	%
Promyelozyten	2-5	%
Myelozyten	8-17	%
Metamyelozyten	10-25	%
Stabkernige neutrophile Granulozyten	8-20	%
Segmentkernige neutrophile Granulozyten	8-16	%
Eosinophile Granulozyten	2-6	%
Basophile Granulozyten	0-1	%
Monozyten	0-3	%
Proerythroblasten	0-2	%
Basophile Erythroblasten	1-4	%
Polychromatische Erythroblasten	12-24	%
Orthochromatische Erythroblasten	2-24	%
Lymphozyten	10-20	%
Plasmazellen	0-3	%
Megakaryozyten	0-1	%

Hilfreich ist zudem eine Bezifferung des Verhältnisses zwischen Granulozyto- und Erythrozytopoese (G:E-Verhältnis). Alle weiteren qualitativen Feststellungen erfolgen im Befundtext.

2.5 Qualitätsstandards

Die quantitative Analyse (Zelldifferenzierung) kann durch eine versierte und ärztlich autorisierte Laborfachkraft erfolgen. Eine wertende Analyse (Befundinterpretation) muss durch einen Facharzt für Innere Medizin mit der Schwerpunktbezeichnung Hämatologie und Internistische Onkologie, einen Facharzt für Patholo-

gie oder einen Facharzt für Laboratoriumsmedizin erfolgen. Der Befund muss die Unterschrift oder eine validierte elektronische Signatur eines Arztes tragen. Die regelmäßige Teilnahme an externen Qualitätskontrollen (Ringversuchen) ist erforderlich, eine Zertifizierung/Akkreditierung des Labors wünschenswert.

3 Durchflusszytometrie

3.1 Indikationen

- Unklare Normabweichungen im maschinellen oder mikroskopischen Blutbild
- Verdacht auf primäre Knochenmarkerkrankungen (Leukämien, Lymphome etc.)
- Remissionskontrollen hämatologischer Erkrankungen bzw.
- Nachweis einer minimalen Resterkrankung
- Verdacht auf neoplastische Infiltration nicht-hämatopoetischer Kompartimente (Liquorraum, Peritoneum, Pleurahöhle etc.).
- Verdacht auf andere klonale hämatopoetische Erkrankungen (z.B. PNH)
- Verdacht auf zellulären Immundefekt (z.B. HIV, CVID)
- Lymphozytentypisierung aus broncho-alveolärer Lavage (BAL)

3.2 Methodischer Hintergrund

Die durchflusszytometrische Charakterisierung von Leukozyten ist eine wichtige Technik zur Messung physiologischer Zellpopulationen (z.B. Quantifizierung von CD4-positiven Helferzellen) sowie zur diagnostischen Einordnung von lymphatischen Neoplasien. Aber auch zum Nachweis von myeloischen Zellen mit normalem oder pathologischen Granulations- oder Antigenexpressionsmuster ist dieses Verfahren etabliert. Ferner können auch Veränderungen erythrozytärer Zellen (z.B. paroxysmale Hämoglobinurie, Sphärozytose) detektiert werden. Die wichtigsten Kenndaten dieser Methode sind:

- Untersuchungsdauer: Die Untersuchungsdauer beträgt bei einer Standardmessung ca. 60 Minuten. Bei speziellen Anwendungen kann sie darüber liegen.
- Vor- und Nachteile: Die Vorteile des Verfahrens bestehen in seiner raschen Durchführbarkeit, seiner guten Reproduzierbarkeit sowie seiner höheren Sensitivität von bis zu $1{:}10^5$. Der hauptsächliche Nachteil besteht in der eingeschränkten Verfügbarkeit, welche auf den notwendigen Technologiegrad zurückzuführen ist.

3.3 Präanalytik

Als Untersuchungsmaterial eigenen sich sämtliche antikoagulierten und nativen Flüssigmaterialien. Der Transport erfolgt bei Raumtemperatur. Das Intervall zwischen Materialgewinnung und Analyse sollte bei antikoagulierten Materialien

im Regelfall 48h nicht übersteigen, Nativflüssigkeiten (z.B. Liquor etc.) sollten innerhalb von 6h nach Entnahme untersucht werden. Spezielle Transportröhrchen für Liquor sollten erwogen werden.

3.4 Analytik

Die Aufarbeitung der Materialien erfolgt nach Standardprozeduren. Im Mittelpunkt steht dabei die Inkubation der Zellsuspension mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder sonstigen Fluoreszenzfarbstoffen. Die Spezifität wird durch den verwendeten Antikörper oder den freien Farbstoff determiniert.

Bezüglich der zu untersuchenden Antigene oder Zielstrukturen existieren größtenteils Empfehlungen. Beispielhaft sei hier auf die Empfehlungen des European Leukemia Net (ELN) und des EuroFlow-Konsortiums verwiesen.

3.5 Qualitätsstandards

Die Durchführung der Analyse kann durch eine versierte und ärztlich autorisierte Laborfachkraft erfolgen. Wichtig ist, dass die Generierung der Quelldaten hochgradig von den Instrumenteneinstellungen abhängig ist und ein hohes Maß an gerätespezifischer Expertise erfordert. Aus diesem Grunde muss eine tägliche interne Qualitätskontrolle und ggf. Anpassung der Fluoreszenzkalibrierung erfolgen.

Die Befundinterpretation ist ebenfalls sehr stark von der zuvor durchgeführten Datenakquisition (sog. Gating) abhängig und muss durch einen Facharzt für Innere Medizin mit der Schwerpunktbezeichnung Hämatologie und Internistische Onkologie, einen Facharzt für Pathologie oder einen Facharzt für Laboratoriumsmedizin erfolgen. Der Befund muss die Unterschrift oder eine validierte elektronische Signatur eines Arztes tragen. Die regelmäßige Teilnahme an externen Qualitätskontrollen (Ringversuchen) ist erforderlich, eine Zertifizierung/Akkreditierung des Labors wünschenswert.

4 Zytogenetik

4.1 Indikationen

- Nachweis oder Ausschluss hämatologischer Erkrankung mit bekannten rekurrenten Chromosomenanomalien
- Erhebung von Prognoseparametern bei Myelodysplasien, Leukämien und Lymphomen
- Remissionskontrollen hämatologischer Erkrankungen

4.2 Methodischer Hintergrund

Zytogenetische Untersuchungstechniken sind bei der Diagnostik und Prognostik hämatologischer Erkrankungen fest etabliert. Viele zytogenetische Aberrationen

haben laut der aktuellen WHO-Klassifikation entitätsdefinierenden Charakter oder dienen als wichtiger Leitbefund. Darüber hinaus kann die Zytogenetik entscheidende prognostische Informationen liefern. Generell wird eine Analyse des vollständigen Chromosomensatzes an Metaphasen (Standard 20 Karyogramme) von der Untersuchung einzelner Loci per Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), welche in der Regel an Interphasen durchgeführt wird, unterschieden. Während der Karyotyp umfassend Auskunft über strukturelle (z.B. Translokationen) und numerische (Aneuploidie) Anomalien geben kann, ist diese Methode relativ wenig sensitiv (ca. 1:25-50). FISH-Untersuchungen liefern dagegen nur Informationen zum untersuchten Chromosomlocus, sind in der Regel jedoch etwas sensitiver (ca. 1:200-500).

Die wichtigsten Kenndaten dieser Methode sind:

- Untersuchungsdauer: Die Untersuchungsdauer beträgt bei einer klassischen Chromosomenanalyse 5-15 Tage. FISH-Analysen können innerhalb von 1-2 Tagen erfolgen oder aber im Rahmen von dringlichen Direktpräparationen innerhalb weniger Stunden.
- Vor- und Nachteile: Die Vorteile des Verfahrens bestehen aus seinem sehr gut gesicherten diagnostischen und prognostischen Stellenwert. Die Nachteile bestehen aus der verhältnismäßig langen Untersuchungsdauer, der geringen Sensitivität (1:20 bis 1:500) und der der sehr starken Erfahrungsabhängigkeit.

4.3 Präanalytik

Da die klassische Chromosomenanalyse als Ausgangsmaterial lebende Zellen benötigt, kommt dem richtigen Antikoagulanz und einem raschen Probentransport hier besondere Bedeutung zu. Die Untersuchung ist prinzipiell nur an Heparin-antikoaguliertem Material möglich. Um die Absterberate der Zellen während des Transportes möglichst gering zu halten, sollten diese bei Raumtemperatur und innerhalb von 24 (-48) Stunden in das zytogenetische Labor kommen. Generell gilt, dass die Wahrscheinlichkeit nicht auswertbarer Untersuchungen mit abnehmender Transportdauer sinkt. FISH-Analysen an Interphasekernen können zwar auch an EDTA-antikoaguliertem Material durchgeführt werden, aus Gründen der Flexibilität und Einfachheit empfiehlt es sich jedoch, diese aus demselben Material wie für die klassische Chromosomenanalyse durchzuführen. Die Materialabnahme muss in ein steriles Gefäß erfolgen. I.d.R. sind 2-5 ml erforderlich, größere Mengen steigern die Sensitivität und Aussagekraft jedoch erheblich.

4.4 Analytik

Gemäß der aktuell gültigen WHO-Klassifikation ist eine Vielzahl von hämatologischen Erkrankungen über rekurrente chromosomale Anomalien definiert. Hierzu zählen u.a. (Auswahl), siehe Tabelle 4:

Tabelle 4: Zytogenetik – krankheitsdefinierende chromosomale Anomalien

Läsion	Klinische Bedeutung
t(6;9)(p23;q34)	Nachweis oder Ausschluss einer zytogenetisch definierten akuten myeloischen Leukämie mit *DEK-NUP214*-Translokation
t(1;22)(p13;q13)	Nachweis oder Ausschluss einer zytogenetisch definierten akuten myeloischen Leukämie mit *RBM15-MLK1*-Translokation
t(9;22)(q34;q11.2)	Nachweis oder Ausschluss einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) oder einer Philadelphia-Chromosom-positiven akuten lymphatischen Leukämie (ALL)
del(5q)	Nachweis oder Ausschluss einer zytogenetisch definierten Myelodysplasie mit isolierter del(5q)
t(v;11)(v;q23)	Nachweis oder Ausschluss einer zytogenetisch definierten akuten Leukämie und rearrangierten *MLL*-Locus
t(1:19)(q23;p13.3)	Nachweis oder Ausschluss einer zytogenetisch definierten B-Linien ALL mit *E2A-PBX1*-Translokation
Hyper- oder Hypodiploidie	Nachweis oder Ausschluss einer zytogenetisch definierten B-Linien ALL mit Hyper- oder Hypodiploidie

Neben diesen entitätsdefinierenden Chromosomenveränderungen existieren zahlreiche zytogenetische Befunde, welche zusätzlich zu den übrigen Untersuchungen diagnostische Schlüsselinformationen für die Diagnosestellung liefern. Hierzu zählen u.a. (Auswahl), siehe Tabelle 5:

Tabelle 5: Zytogenetik – weitere chromosomale Anomalien als Leitbefund

Läsion	Klinische Bedeutung
t(11;14)(q13;q32)	Leitbefund bei Mantelzell-Lymphom
t(14;18)(q32;q21)	Leitbefund bei Follikulärem Lymphom
t(8;14)(q24;q32)	Leitbefund bei Burkitt-Lymphom
inv(14)(q11q32) oder t(14;14)(q11;q32)	Leitbefund bei T-Prolymphozyten-Leukämie

Schließlich konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, dass zytogenetische Befunde eine überragende Bedeutung bei der Prognostizierung hämatologischer Entitäten haben. Auf eine detaillierte Darstellung wird hier aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

4.5 Qualitätsstandards

Bei der Chromosomenanalyse wird angestrebt, mindestens 20 Metaphasen zu analysieren. Wird eine durchgehende klonale Aberration nachgewiesen, ist eine Untersuchung von zumindest 10 Metaphasen ausreichend. Bei der FISH-Analyse sollten mindestens 100 Interphasekerne untersucht werden. Die Ergebnisse der Chromosomenanalyse und der FISH-Analyse werden nach der aktuellen internationalen Nomenklatur (international system for human cytogenetic nomenclature, ISCN) angegeben.

Die Durchführung der Analyse kann durch eine versierte und ärztlich autorisierte Laborfachkraft erfolgen. Die Kontrolle der erhobenen Chromosomenbefunde sowie die Befundinterpretation sollten durch eine(n) Fachhumangenetiker(in),

eine(n) Facharzt/Fachärztin für Humangenetik oder eine vergleichbar qualifizierte Person erfolgen. Der Befund muss die Unterschrift oder eine validierte elektronische Signatur eines Arztes tragen. Die regelmäßige Teilnahme an externen Qualitätskontrollen (Ringversuchen) ist erforderlich, eine Zertifizierung/Akkreditierung des Labors wünschenswert.

5 Molekulargenetik

5.1 Indikationen

- Nachweis oder Ausschluss hämatologischer Erkrankung mit bekannten rekurrenten molekularen Aberrationen
- Erhebung von Prognoseparametern bei Myelodysplasien, Leukämien und Lymphomen
- Remissionskontrollen hämatologischer Erkrankungen, v.a. Nachweis einer minimalen Resterkrankung (MRD)
- Bestimmung des hämatopoetischen Chimärismus nach allogener Stammzelltransplantation

5.2 Methodischer Hintergrund

Molekulargenetische Untersuchungstechniken besitzen mittlerweile einen sehr gut etablierten Stellenwert bei der Diagnostik, Prognostik und Verlaufsbeobachtung hämatologischer Erkrankungen. Zum einen basieren sie noch auf konventionellen Polymerasekettenreaktionen (PCR), andererseits werden zunehmend moderne genomische Verfahren eingesetzt, welche die simultanen und quantitative Analyse einer großen Zahl von Genen bis hin zur vollständigen Untersuchung ganzer Genome, Exome, Transkriptome etc. erlauben. Auf Grund dieser enormen analytischen Bandbreite, muss die Indikation für die Bestimmung verschiedener Parameter sehr sorgfältig gestellt werden.

Die wichtigsten Kenndaten dieser Methode sind:

- Untersuchungsdauer: Die Untersuchungsdauer beträgt bei einer konventionellen PCR 2-4 Stunden. Verfahren, welche DNA-Sequenzierungen mit einschließen, können 24h (kurze DNA-/RNA-Abschnitte) bis zwei Wochen (Genomanalysen) dauern.
- Vor- und Nachteile: Die Vorteile des Verfahrens bestehen in seiner unübertroffenen Spezifität und Sensitivität. Die hauptsächlichen Nachteile bestehen aus dem außerordentlich hohen Spezialisierungsgrad und den Kosten.

5.3 Präanalytik

Als Untersuchungsmaterial eignet sich prinzipiell jede zellhaltige Körperflüssigkeit, insbesondere peripheres Blut, Knochenmarkaspirate und Punktate. Ethylendiamintetraacetat (EDTA) ist für gerinnbare Flüssigkeiten das Antikoagulanz der Wahl, anderer Antikoagulantien wie Heparin können jedoch auch angewendet

werden. Auf Grund der kurzen Halbwertzeit von Ribonukleinsäure (RNS) muss ein rascher Transport (innerhalb 24 (-48h)) bei Raumtemperatur in das Untersuchungslabor sichergestellt werden. Alternativ können Abnahmegefäße mit Stabilisatorzusätzen Verwendung finden, deren Einsatz ist jedoch noch nicht für alle nachfolgenden Methoden etabliert ist.

Während die gezielte Untersuchung pathogener somatischer (erworbener) Genaberrationen keinen besonderen Regularien unterliegt, bedürfen Keimbahnanalysen gemäß Gendiagnostikgesetz (GenDG) grundsätzlich der gesonderten Aufklärung und Zustimmung durch den Patienten.

5.4 Analytik

Viele molekulargenetische Nachweisverfahren basieren auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR). Die hierbei entstehenden Amplifikate können durch elektrophoretische oder fluoreszenzgestützte Methoden direkt dargestellt werden. Letztere erlauben auch eine akkurate Quantifizierung im Ausgangsmaterial. Methodisch gibt es in der Molekulargenetik zwei Problemfelder: Falsch-negative Ergebnisse durch Nukleinsäuredegradation und falsch-positive Ergebnisse durch Kreuzkontamination. Um erstere zu reduzieren ist das stete Mitführen einer probenspezifischen Positivkontrolle (interne Kontrolle) obligat. Dies kann gleichzeitig als quantitative Referenz genutzt werden. Kreuzkontaminationen sollten durch eine strikte Trennung von präparativen und analytischen Schritten ausgeschlossen werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, Uracil-haltige kontaminierende Amplifikate durch einen Verdau mit Uracil-DNA-Glykosylase zu eliminieren.

In zunehmendem Maße kommen heute Sequenzierungstechniken zur Anwendung. Diese basieren vielfach noch auf dem Kettenabbruchprinzip nach Sanger. Prinzipiell ist eine doppelsträngige Sequenzierung zu bevorzugen, welche die Fehlerwahrscheinlichkeit des Verfahrens reduziert. Der Abgleich der ermittelten Nukleinsäurensequenz mit öffentlichen Datenbanken erfordert spezielle Expertise, insbesondere, wenn sie variable Genregionen (z.B. Immunglobulin-Ketten) betrifft.

Eine neue Entwicklung innerhalb der Molekulargenetik ist die Anwendung von genomischen Hochdurchsatzverfahren, die die gleichzeitige (parallele) Sequenzierung einer Vielzahl von Genabschnitten oder Genen oder sogar des gesamten Genoms ermöglichen. Obwohl diese Verfahren wirtschaftlich immer erschwinglicher, methodisch immer einfacher und zeitlich immer schneller werden, handelt es sich bisher noch um eine Methodik, die eine hochkomplexe Datenanalyse nach sich zieht. Zudem ist der klinische Stellenwert speziell zur Prognose vieler neuer molekularer Aberrationen noch nicht geklärt, so dassdaß ein wichtige Aufgabe für die nahe Zukunft sein wird, die diagnostische und prognostische Wertigkeit der einzelnen Aberrationen zu klären sowie die methodischen Voraussetzungen (z.B. Sensitivität) festzulegen.

Die Zahl molekulargenetischer Läsionen, die eine diagnostische oder prognostische Bedeutung haben, nimmt stetig zu. Nicht alle sind jedoch bereits klinisch

hinreichend validiert. Als Veränderungen von gesichertem Stellenwert gelten (Auswahl), siehe Tabelle 6:

Tabelle 6: Molekularbiologie – Läsionen mit gesichertem Stellenwert

Läsion	Klinische Bedeutung
BCR-ABL1	Nachweis oder Ausschluss einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) oder einer Philadelphia-Chromosom-positiven akuten lymphatischen Leukämie (ALL), MRD-Nachweis
JAK2 V617F-Mutation JAK2 Exon 12-Mutationen *MPL* W515-Mutationen *CALR*-Mutationen	Nachweis oder Ausschluss myeloproliferativer Neoplasien
RUNX1/RUNX1T1	Nachweis oder Ausschluss einer zyto- bzw. molekulargenetisch definierten AML, MRD-Nachweis
PML-RARA	Nachweis oder Ausschluss einer zyto- bzw. molekulargenetisch definierten AML (akute Promyelozytenleukämie), MRD-Nachweis
CBFB-MYH11	Nachweis oder Ausschluss einer zyto- bzw. molekulargenetisch definierten AML, MRD-Nachweis
NPM1-Mutationen	Nachweis oder Ausschluss einer molekulargenetisch definierten AML (provisorische Entität) sowie Prognosefaktor
CEBPA-Mutation	Nachweis oder Ausschluss einer molekulargenetisch definierten AML (provisorische Entität) sowie Prognosefaktor
PDGFRA/PDGFRB-Rerrangement	Nachweis oder Ausschluss einer entitätsdefinierenden klonalen Eosinophilie
P53-Mutationen (Exone 4-10)	Nachweis einer Hochrisiko-CLL

5.5 Qualitätsstandards

Die Durchführung der Analyse kann durch eine versierte und ärztlich autorisierte Laborfachkraft erfolgen. Die Kontrolle der erhobenen Befunde sowie die Befundinterpretation sollte durch eine(n) Fachhumangenetiker(in), eine(n) Facharzt/Fachärztin für Humangenetik oder eine vergleichbar qualifizierte Person erfolgen. Der Befund muss die Unterschrift oder eine validierte elektronische Signatur eines Arztes tragen. Die regelmäßige Teilnahme an externen Qualitätskontrollen (Ringversuchen) ist erforderlich, eine Zertifizierung/Akkreditierung des Labors wünschenswert.

6 Histopathologie (Knochenmark)

6.1 Indikationen

Wenn im Rahmen der Erstdiagnose einer hämatologischen Systemerkrankung die Untersuchung der Knochenmarkzytologie angestrebt wird, ist es generell empfehlenswert, auch eine Knochenmarkstanzbiopsie zu gewinnen, um ein möglichst vollständiges Bild einer Knochenmarkbeteiligung der Erkrankung zu gewinnen.

Spezielle Indikationen für die Gewinnung einer Knochenmarkshistologie sind (Auswahl):

- Ausmass einer Knochenmarkinfiltration bei Leukämien, Lymphomen, MDS (s. ELN-Guidelines 2013) und beim Multiplen Myelom im initialen Staging oder zur Beurteilung des Remissionsgrades nach Therapie sowie Bestimmung des Anteils der verbliebenen Resthämatopoese
- Diagnostik myeloproliferativer Knochenmarksneoplasien, speziell auch bei Punctio sicca (z.B. bei primärer Myelofibrose, Infiltrate eines klassischen Hodgkin-Lymphoms, Haarzell-Leukämie, etc.)
- Diagnostik fokaler Prozesse im Knochenmark (Metastasen solider Tumoren, Nachweis einer granulomatösen Erkrankung, etc.)

6.2 Methodischer Hintergrund

Histopathologische Untersuchungen des Knochenmarks, insbesondere aber auch von soliden Geweben, insbesondere von Lymphknoten, stellen nach wie vor bei vielen hämatologischen Entitäten, v.a. bei malignen Lymphomen, den diagnostischen Goldstandard dar. Das Verfahren ist langjährig etabliert und bei der Untersuchung solider Gewebe praktisch konkurrenzlos. Ergänzt wird es heutzutage durch immunhistochemische und molekularpathologische Techniken. Als einziges der hier aufgeführten Verfahren erlaubt es Feststellungen im geweblichen Kontext. Viele Entitäten sind in der derzeit gültigen WHO-Klassifikation sehr detailliert charakterisiert und allgemeingültig definiert.

Die wichtigsten Kenndaten dieser Methode sind:

- Untersuchungsdauer: Die Untersuchungsdauer variiert in Abhängigkeit von Material und Fragestellung zwischen wenigen Stunden (sog. Schnellschnitt) und mehreren Tagen (z.B. komplexe immunhistochemische und molekulare Untersuchungen an Knochenmark und Lymphknoten).
- Vor- und Nachteile: Die Vorteile des Verfahrens bestehen in seiner langjährigen Etablierung und insbesondere der sehr guten Spezifität. Die hauptsächlichen Nachteile bestehen aus der hohen Erfahrungsabhängigkeit sowie der hieraus resultierenden sehr beschränkten Standardisierungsmöglichkeit.

6.3 Präanalytik

Voraussetzung für eine aussagekräftige histologische Untersuchung einer Knochenmarkstanze ist die Gewinnung von repräsentativem Material. Die Gewinnung des Stanzzylinders erfolgt in der Regel im Bereich der Spina iliaca posterior superior, die Länge des Stanzzylinders sollte mindestens 1,0 cm, wenn möglich aber 2,0 cm betragen. Mit der Übersendung der Knochenmarksstanze an ein Institut für Pathologie sollten auch alle relevanten klinischen Angaben (Blutbild, Knochenmarkszytologie, Vorerkrankungen, etc.) und insbesondere eine klinische Fragestellung übermittelt werden. Zur Fixierung wird üblicherweise neutral-gepuffertes Formalin verwendet, in der Pathologie folgt dann eine Paraffineinbettung,

die zunächst eine Entkalkungsprozedur erforderlich macht. Diese Aufarbeitung führt, beispielsweise im Gegensatz zu einer Einbettung in Kunstharze, zu einer weitgehenden Erhaltung der Oberflächenantigene der Knochenmarkszellen, die für häufige immunhistochemische Fragestellungen wichtig ist.

6.4 Analytik

Obligat an Knochenmarksstanzbiopsaten ist die Durchführung einer HE-, ggf. auch einer Giemsa-Färbung, welche eine gute Übersicht über die verschiedenen Zellpopulationen im Knochenmark erlauben. Die Untersuchung erfolgt an einem qualitativ hochwertigen Lichmikroskop durch eine(n) Arzt/Ärztin für Pathologie, der/die spezielle Erfahrung in der hämatopathologischen Diagnostik aufweist. Der Knochenmarksbefund sollte Angaben zur Zellularität, zur topographischen Verteilung der zellulären Elemente sowie Einschätzungen zur Zellmorphologie erhalten und natürlich pathologische Veränderungen/Infiltrate beschreiben. Für viele Fragestellungen (z.B. Subklassifikation eines Lymphominfiltrates) sind immunhistochemische Untersuchungen erforderlich, gelegentlich müssen molekulare Untersuchungen (z.B. Klonlitätsanalysen bei der Frage einer diskreten Knochenmarksinfiltration durch ein Lymphom) durchgeführt werden.

6.5 Qualitätsstandards

Die Durchführung der Pränanalytik kann durch eine versierte und ärztlich autorisierte Laborfachkraft erfolgen. Die Befunderhebung sowie die Befundinterpretation müssen durch einen Facharzt für Pathologie erfolgen. Der Befund muss die Unterschrift oder eine validierte elektronische Signatur eines Arztes tragen. Die regelmäßige Teilnahme an externen Qualitätskontrollen (Ringversuchen) ist erforderlich, eine Zertifizierung/Akkreditierung des Labors wünschenswert.

9 Weiterführende Literatur

1. Bain B. Blood cells: A practical guide (4. Aufl.). Wiley-Blackwell, Hoboken, 2006
2. Baurmann H, Bettelheim P, Diem H, Gassmann W, Nebe T. Lymphozytenmorphologie im Blutausstrich - Vorstellung einer überarbeiteten Nomenklatur und Systematik. Lab Med 35: 261-270, 2011
3. Bundesärztekammer. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dt Ärzteblatt 39: A1822, 2013.
4. Haferlach T, Diem H, Haferlach C, Kern W, Kohlmann A, Schaefer H-E, Schnittger S. Labordiagnostik bei Leukämien und Lymphomen (3. Aufl.). Uni-Med Verlag, 2011
5. Naeim F, Rao PN, Grody WW. Hematopathology (1. Aufl.), Elsevier London, 2008
6. Oertel J, Oertel B. Hämatologische Diagnostik im Blutausstrich. Georg Thieme-Verlag Stuttgart, 2005

7. Ortolani C. Flow cytometry of hematological malignancies (1. Aufl.). John Wiley & Sons, Chichester, 2011
8. Provan D, Gribben J. Molecular Hematology (2. Aufl). Blackwell Publishing Oxford, 2005
9. Sack U, Tarnok A, Rothe G. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Karger Medical and Scientific Publishers, Basel, 2007
10. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). Karger Medical and Scientific Publishers, Basel, 2013
11. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). WHO Press, Geneva, 2008
12. Thomas L. Labor und Diagnose (8. Aufl.). TH-Books Verlagsgesellschaft Frankfurt/Main, 2012

15 Adressen der Autoren

Prof. Dr. med. Karl-Anton Kreuzer
Klink I für Innere Medizin
Klinikum der Universität zu Köln
Kerpener Straße 62
D-50937 Köln
Tel.: +49 221 478-97626
E-Mail: karl-anton.kreuzer@uni-koeln.de

Prof. Dr. med. Peter Bettelheim
Abteilung für Hämatologie, internistische Onkologie und Stammzelltransplantation
Krankenhaus der Elisabethinen Linz Ges mbH
Fadingerstraße 1
A-4020 Linz
Tel.: +43 732 7676-0
E-Mail: peter@bettelheim.eu

Prof. Dr. med. Dr. phil. Torsten Haferlach
Münchner Leukämie Labor GmbH
Max-Lebsche-Platz 31
D-81377 München
Tel.: +49 221 30 99017-0
E-Mail: torsten.haferlach@mll.com

Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald
Institut für Pathologie
Universitätsklinikum Würzburg
Joseph-Schneider-Straße 2
D-97080 Würzburg

Tel.: +49 931 31-81199
E-Mail: rosenwald@uni-wuerzburg.de

16 Erklärung zu möglichen Interessenkonflikten

nach den Regeln der DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie und den Empfehlungen der AWMF (Version vom 23. April 2010) und internationalen Empfehlungen