

Arbeitskreis Laboratorium der DGHO

T. Nebe, H. Baurmann, P. Bettelheim, T. Binder, H. Diem, H. Engel, W. Gassmann, K. Gutensohn,
 T. Haferlach, S. Heller, W. Kern, S. Krause, M. Ossendorf, A. v. Rücker, G. Stamminger, C. Thiede

Inhalt

Anwendungsbereich	2
5.1 Personal.....	3
5.3 Geräte und Einrichtungen	4
5.4 Präanalytische Maßnahmen	5
5.5 Untersuchungsverfahren	6
5.5.1 Voll- und teilautomatisierte Verfahren in der Hämatologie zur Zellzählung von Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, zur Messung der Zellgröße und zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration	6
5.5.2 Manuelle oder isolierte Hämoglobinbestimmung	11
5.5.3 Manuelle Hämatokrit-Bestimmung (Mikrohämatokrit, zellulärer Volumenanteil)	11
5.5.4 Manuelle Zählung von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten im Blut.....	12
5.5.5 Differenzialblutbildanalyse mit automatisierten Verfahren	12
5.5.6 Mikroskopische Differenzierung von Blutaussstrichen (Differenzialblutbild)	13
5.5.7 Automatisierte Retikulozytenbestimmung	15
5.5.8 Manuelle Retikulozytenbestimmung	16
5.5.9 Knochenmarkpräparate	17
5.5.10 Zählung von Zellen in extravaskulären Körperflüssigkeiten.....	19
5.5.11 Differenzierung von kernhaltigen Zellen in extravaskulären Körperflüssigkeiten	20
5.5.12 Malariadiagnostik.....	22
5.5.13 Nachweis abnormaler Hämoglobine	24
5.5.14 Erythrozytenmembran-Diagnostik.....	26
5.5.15 Immunphänotypisierung.....	27
5.5.16 Molekulardiagnostische Methoden	31
5.6 Sicherung der Qualität der Untersuchungsverfahren	32
5.6.1 Automatisierte Verfahren	32
5.6.1.1 Kontrollverfahren	32
5.6.1.2 Kalibrationsverfahren.....	33
5.6.2 Longitudinale Überprüfung der Messungen mit automatisierten Blutzellzählgeräten	34
5.6.3 Ringversuche	35
5.8. Befunde	35
Anmerkungen / Notizen / Ergänzungen	36

Anwendungsbereich

Diese Checkliste erstreckt sich auf alle Bereiche der hämatologischen Diagnostik, einschließlich Blutbild-Erstellung, Mikroskopie, Immunphänotypisierung, Hämoglobinopathien und Erythrozytentests.

Siehe auch: Checklisten für Medizinische Laboratorien – Allgemeiner Teil

Checklisten Immunhämatologie und Transfusionsmedizin (8)

Checkliste Klinische Chemie und Hämatologie – Allgemeine Anforderungen

Checkliste Klinische Chemie und Hämatologie – Hämostaseologische Untersuchungen

Checkliste Humangenetik-Molekulargenetik

Angaben zum Laboratorium	
Name:	
Aktenzeichen:	
	Verfahrensnummer Phase
Datum Begutachtung:	
Standort:	
Name des Begutachters	

5.1 Personal

		U*	O*	Bemerkungen
5.1.1	Ist der / die Leiter/in der Abteilung für die beantragten Untersuchungsverfahren fachlich ausgewiesen und verfügt er über eine anerkannte Weiterbildung als entsprechend qualifizierter Facharzt oder Fachwissenschaftler?			
5.1.2	Nimmt sie/er regelmäßig an Fortbildungsveranstaltungen auf dem jeweiligen Gebiet teil?			
5.1.3	Haben die verantwortlichen Mitarbeiter für Blutzellzählungen, Blutausstriche, Zytologie und Immunphänotypisierung eine spezielle Weiterbildung? ¹			
5.1.4	Gibt es in dem Labor eine Fach-MTLA für Hämatologie?			
5.1.5	Werden alle Mitarbeiter in die von ihnen durchgeführten Methoden nachweislich eingearbeitet?			
5.1.6	Wird das Personal, das in der Hämatologie tätig ist, auf Farbumterscheidungsfähigkeit untersucht (z.B. Rot-Grün-Blindheit) ² ?			
5.1.7	Nimmt das Personal in diesem Bereich regelmäßig an <i>internen</i> Fortbildungen teil und ist dies dokumentiert? ³			
5.1.8	Wie häufig werden diese Fortbildungsveranstaltungen durchgeführt? Wie häufig werden hämatologische Themen behandelt?			
5.1.9	Nimmt das Personal in diesem Bereich regelmäßig an <i>externen</i> Fortbildungen teil und ist dies dokumentiert?			

¹ Mindestens ein(e) Mitarbeiter(in) des MTD an Krankenhäusern mit hämatologischer Abteilung sollten eine Fachweiterbildung für Hämatologie besitzen. Die Befundung mit Diagnosestellung sollte nur durch einen zytologisch weitergebildeten Hämatologen oder Laborarzt erfolgen, der ggf. einen erfahreneren Kollegen hinzuziehen kann.

² Das heißt nicht, dass technisches Personal mit beeinträchtigtem Farbumterscheidungsvermögen nicht beschäftigt werden darf, sondern nur, dass die Mitarbeiter untersucht und ihre Aufgaben und Verantwortungsbereiche entsprechend zugewiesen werden müssen.

³ Hinweis für den Begutachter: Gibt es eine regelmäßige interne Weiterbildung? Ist dort eine spezielle Weiterbildung für Hämatologie und Zytologie vorgesehen? Für die hämatologische Spezialdiagnostik werden regelmäßige auch externe Fortbildungsveranstaltungen angeboten. Wer hat an diesen wie oft teilgenommen?

5.3 Geräte und Einrichtungen

		U*	O*	Bemerkungen
5.3.1	Werden Pipetten für die Herstellung von Verdünnungen (mit fixiertem Volumen oder einstellbar) in spezifischen und definierten Intervallen auf Genauigkeit und Reproduzierbarkeit überprüft und werden die Ergebnisse festgehalten?			
5.3.2	Gibt es eine gesonderte Vorschrift zur Verdünnung von Vollblut? ⁴			
5.3.3	Existiert ein lichtstarkes Durchlichtmikroskop mit Ölimmerionsobjektiven, ggf. mit Mitbeobachtereinrichtung und/oder Kamera?			
5.3.4	Ist eine Vorgehensweise etabliert und in Gebrauch, dass bei Vorhandensein mehrerer Geräte zur Erstellung gleicher Parameter (Blutbildgeräte, Durchflusszytometer etc.) innerhalb einer Einheit (Krankenhaus, Labor) ein regelmäßiger Vergleich stattfindet? Sind für die systematischen Abweichungen Toleranzgrenzen definiert und wurden Maßnahmen ergriffen, wenn diese überschritten wurden? ⁵			
5.3.5	Unterstützt die Gerätesoftware oder die Labor-EDV den X-B-Algorithmus (Bull-Algorithmus, gleitender Mittelwert), um einen Geräter drift rechtzeitig zu erkennen? ⁶			
5.3.6	Unterstützt die Gerätesoftware oder die Labor-EDV eine grafische Darstellung von Ergebnissen (Mikroskop-Bilder, zytometrische Dot-Plots), die eine Fremdbeurteilung bzw. Fernbeurteilung erlauben?			
5.3.7	Wird bei Fluoreszenzmikroskopen über den Betrieb Nachweis geführt und werden Leuchtmittel fristgemäß gewechselt? Wird die Intensität durch geeignete Positivkontrollen regelmäßig überprüft?			

⁴ Vollblut weist eine andere Viskosität als wässrige Reagenzien auf und zeigt ein anderes Verhalten beim Pipettieren (Benetzung, Flüssigkeit auf der Außenseite der Pipettenspitze). Dies spielt z.B. bei der Vorverdünnung von Kinderblutproben oder Kapillarblut eine kritische Rolle.

⁵ Sind in einer Einheit (Krankenhaus, Labor) mehrere Blutbildgeräte vorhanden, an denen Patientenproben abwechselnd gemessen werden, so können auch bei baugleichen Geräten systematische Messunterschiede zwischen den Geräten klinische Konsequenzen auslösen (z.B. Hb- oder Thrombozyten-Abfall oder -anstieg). Ein alleiniger Vergleich von Kontrollmaterial kann ggf. nicht ausreichend sein, da dieses z.B. keine niedrigen Thrombozytenzahlen abdeckt. Wird routinemäßig eine Nachmessung bei auffälligen Proben an einem Zweitgerät vorgenommen, so können diese Messergebnisse sinnvoll herangezogen werden. Eine Bland-Altman-Darstellung ist zu diesem Vergleich neben einer Korrelationsanalyse besonders geeignet.

⁶ Der Bull-Algorithmus berechnet den gleitenden Mittelwert aus 20 Messungen, weil man davon ausgehen kann, dass bei mehreren Personen gleiche Mittelwerte entstehen. So können bei großen Messserien rechtzeitig vor der Messung von Kontrollen Geräteprobleme erkannt werden. Diese Vorgehensweise wurde von Bull erstmals für Erythrozytenindices und den Hb-Wert etabliert.

5.4 Präanalytische Maßnahmen

		U*	O*	Bemerkungen
5.4.1	Werden die Routineproben für Blutzellzählungen und für Blutausstriche in Röhrchen gesammelt, die ein EDTA-Salz enthalten?			
5.4.2	Werden Proben für die Zellzählung auf korrekte Füllung und auf Gerinnsel vor der Ausgabe der Ergebnisse inspiziert (visuell, oder Überprüfung des von dem Zählgerät herausgegebenen Histogramms)? ⁸			
5.4.3	Werden in Kapillaren gesammelte Proben für Mikrohämatokrit oder unter Einsatz von Kapillaren verdünnte Proben, wenn immer es möglich ist, doppelt gemessen? Werden sie mit einer eindeutigen Patientenidentifikation versehen und wird die Patientenidentifikation während des ganzen Messprozesses beibehalten?			
5.4.4	Werden alle Blutproben noch einmal vollständig unmittelbar vor der Untersuchung durchmischt?			
5.4.5	Werden alle Blutproben bei geeigneter Temperatur transportiert und vor der Untersuchung auf Vitalität untersucht? Wie findet eine solche Vitalitätsprüfung statt?			
5.4.6	Werden alle Punktate noch einmal vollständig unmittelbar vor der Untersuchung durchmischt und filtriert?			

⁷ Blutproben für hämatologische Routineuntersuchungen (z. B. Zellzählungen, Leukozytendifferenzierungen) müssen unter Zusatz von Natrium- oder Kalium-EDTA gesammelt werden, um die Veränderungen der Zellcharakteristika zu minimieren. Dinatrium- und Trinatrium-EDTA weisen systematische Unterschiede auf. Oxalat kann unerwünschte morphologische Veränderungen, wie zytoplasmatische Vakuolen, zytoplasmatische Kristallisationen und unregelmäßige Lobulierungen des Zellkerns hervorrufen.

Heparin kann Verklumpungen von Zellelementen (besonders der Thrombozyten) hervorrufen, ebenso Pseudoleukozytose mit Pseudothrombozytopenie bei einigen Blutzählgeräten und einen beeinträchtigenden bläulichen Hintergrund bei der Beurteilung der Blutausstriche. Zitrat kann bei einigen Fällen EDTA-assoziiertes Pseudothrombopenie nützlich sein, jedoch müssen so gewonnene Zellzählungen auf den Verdünnungseffekt rechnerisch angepasst und ebenfalls mikroskopisch kontrolliert werden (eine Pseudothrombozytopenie kann auch in Citratblut vorkommen).

⁸ Proben für die Zellzählung müssen auf Gerinnsel jeglicher Größe überprüft werden, bevor die Ergebnisse herausgegeben werden. Dies kann visuell oder mit einem Spatel vor der Testung geschehen. Zusätzlich zeigen sich Mikrogerinnsel häufig in den Histogrammen voll- oder teilautomatisierter Messgeräte. Es muss Erfahrung im Labor mit der Beurteilung solcher Muster bestehen. Kleine Gerinnsel können auch mikroskopisch festgestellt werden, wenn eine mikroskopische Blutbildendifferenzierung in der gleichen Probe durchgeführt wird.

5.4.7	Welche Stabilisierung, Transporttemperatur und maximale Versanddauer wurden für die einzelnen Probenarten <ul style="list-style-type: none"> - Blut, - Knochenmark (KM), - Aszites - Pleurapunktate, - Liquor - Lymphknoten, bzw. - Lavage festgelegt? ⁹			
-------	---	--	--	--

5.5 Untersuchungsverfahren

5.5.1 Voll- und teilautomatisierte Verfahren in der Hämatologie zur Zellzählung von Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, zur Messung der Zellgröße und zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.1.1	Ist im Labor ein automatisiertes oder teilautomatisiertes Messgerät im Einsatz?			
5.5.1.2	Werden Messungen aus vorverdünnten Blutproben durchgeführt (z.B. Kapillar- oder Kinderblutproben) und wurden diese validiert? ¹⁰			
5.5.1.3	Werden Leerwert-Zählungen mit den Verdünnungs-lösungen und den Reagenzien für die Lyse durchgeführt, um Kontaminationen aufzudecken? ¹¹			
5.5.1.4	Werden Messungen im offenen und geschlossenen Modus durchgeführt und werden diese verglichen? ¹²			
5.5.1.5	Ist eine Verfahrensweise im Labor etabliert, um überalterte Blutproben zu erkennen? ¹³ Sind dafür Bewertungsgrenzen definiert?			

⁹ Native Zellsuspensionen aus Liquor, Lavage und Lymphknoten haben nur eine sehr kurze Stabilität (auch gekühlt nur <<2 Stunden), sofern sie nicht anderweitig stabilisiert oder fixiert werden.

¹⁰ Nicht alle Geräte (Methoden) vertragen eine Vorverdünnung des Vollblutes, weshalb die Vorverdünnung des Blutes mit Puffer-lösung (PBS, NaCl) unbedingt validiert werden muss (z.B. Kapillarblut bei Säuglingen).

¹¹ Leerwert-Zählungen sind notwendig, um eine Kontamination von Verdünnungslösungen und Lyse-Reagenzien mit Partikeln aufzudecken. Darüber hinaus kann so auch elektronisches Hintergrundrauschen erkannt werden (z.B. durch Störsignale aus externen Geräten; Stromnetz), das die Zellzählungen beeinflussen könnte. Die Häufigkeit solcher Leerwert-Zählungen wird durch die Empfehlungen des Herstellers und durch die individuellen Erfahrungen des Labors bestimmt.

¹² Hämatologievollautomaten besitzen in der Regel eine automatische Probenzuführung im Rackmodus und eine Möglichkeit, Einzelproben manuell zuzuführen. Dabei werden zumeist unterschiedliche Leitungssysteme im Gerät verwendet, was je nach Gerät zu systematischen Unterschieden führen kann.

¹³ Einsende-Laboratorien mit versandtem Material unterliegen diesem Problem in besonderem Maße. Temperaturschwankungen bzw. Extremwerte beim Transport können eine geringe Vitalität zur Folge haben, worunter zuerst die Granulozyten leiden. Aber auch im Krankenhaus bleiben Blutproben nach der Entnahme liegen oder werden außerhalb der Arbeitszeit des Labors abgenommen. Obwohl der Entnahmezeitpunkt der Blutprobe dokumentiert sein muss, muss immer mit solchen Pro-

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.1.6	Ist eine Verfahrensweise im Labor etabliert, um angeronnene Blutproben zu erkennen?			
5.5.1.7	Besteht eine schriftlich festgelegte Verfahrensweise, die die Aufdeckung und Korrektur der mit Zellzählgeräten ermittelten Leukozytenzahlen bei Gegenwart von kernhaltigen roten Vorstufen, Makrothrombozyten oder Megakaryozytenkernen festlegt, und ist sie auch in Gebrauch? ¹⁴			
5.5.1.8	Gibt es eine schriftlich festgelegte und auch in Benutzung befindliche Verfahrensweise, die sporadisch auftretende, aber klinisch relevante Fehlbestimmungen mit automatisierten Verfahren aufdeckt? ¹⁵			
5.5.1.9	Werden die Partikel-Indizes der Erythrozyten (MCV, MCH und MCHC) routinemäßig überwacht, um Fehler und Verwechslungen aufzudecken? ¹⁶			

ben gerechnet werden. Selbst unter stabilisierten Bedingungen kommt es am zweiten Tag zunehmend zum vermehrten Absterben von Neutrophilen, deren Inhaltsstoffe die Vitalität auch der übrigen Leukozyten beeinträchtigt. Die Leukozytenzahl und das Differenzialblutbild werden zuerst in Mitleidenschaft gezogen.

¹⁴ Der Einfluss kernhaltiger roter Vorstufen und von Megakaryozyten im Blutstrom auf den scheinbaren Leukozytenwert ist vom eingesetzten Messsystem abhängig. Jedes Labor sollte seine Blutzellzählgeräte evaluieren und angemessene Vorgehensweisen für die Aufdeckung und Korrektur dieser Phänomene entwickeln.

Zellzählgeräte schließen je nach Typ einen Teil oder alle kernhaltigen erythroiden Zellen in die „Leukozytenzahl“ ein. Es muss eine schriftlich festgelegte und auch in Gebrauch befindliche Verfahrensweise existieren, die die mit den Zählgeräten ermittelten Leukozytenzahlen entsprechend dem Anteil der kernhaltigen erythroiden Vorstufen, Makrothrombozyten oder Megakaryozyten bei AML bzw. CMPE wie der Essentiellen Thrombozythämie korrigiert. Dies ist von Bedeutung, damit falsch hohe Befunde für die Leukozytenzahlen verhindert werden. Bei einigen Blutzellzählgeräten können kernhaltige erythroide Vorläufer oder Megakaryozyten histo-graphisch oder cytophisch abgegrenzt werden. Dies kann als Anhaltspunkt für die Notwendigkeit einer mikroskopischen Differenzierung von Blutaussstrichen genommen werden. Das Labor muss selbst untersuchen, ob die vorhandenen Zählgeräte einen Teil oder alle nicht leukozytären Zellen in die gemessene „Leukozytenzahl“ einschließen.

¹⁵ Dies betrifft z.B. die Pseudomakrozytose durch Geldrollenbildung oder Agglutinate von Erythrozyten, Leukozytose mit falscher Hämoglobinbestimmung, falsch niedrigen Erythrozytenzahlen und Hämatokrit, bei Hyperlipidämie oder falsch hohe Thrombozytenzahlen bei akuten Leukämien mit Zytoplasmafragmenten oder bei präzipitierenden Kryoglobulinen.

¹⁶ Die Partikel-Indizes der Erythrozyten (MCV, MCH, MCHC) sollten routinemäßig überwacht werden, um Fehler und Verwechslungen, Gerätefehlfunktionen, oder seltene Ereignisse aufzudecken. Bei vielen automatisierten Verfahren ist der MCHC der nützlichste Parameter, um die Korrektheit der Ergebnisse des roten Blutbildes longitudinal zu überprüfen. Da der MCHC innerhalb eines engen Bereichs variiert, wird ein abnormales MCHC häufig ein Zeichen für das Vorliegen von seltenen Ereignissen bei den Erythrozyten sein. Real erhöhte MCHC können bei der Sphärozytose gefunden werden, während verminderte MCHC mit einem geringen MCV bei der Eisenmangelanämie einhergehen können. Wenn entsprechende Veränderungen im Ausstrich nicht gefunden werden können, ist es wahrscheinlich, dass einer oder mehrere der gemessenen Parameter der Erythrozyten falsch sind. Falsche Ergebnisse können durch Gerätefehlfunktionen hervorgerufen sein oder durch Eigenschaften der zu untersuchenden Blutprobe.

Einige Beispiele: Gelegentliche Erhöhung des MCV und des MCHC bei Kälteagglutininen, falsch erhöhtes MCHC bei Lipämie und abnormen Plasmaproteinen, gelegentliche Verminderung des MCHC bei Leukozytose oder osmotischen Effekten wie bei Hyperglykämie. MCV und MCH sind für einen individuellen Patienten recht konstant. Eine Überprüfung dieser Indizes durch ein Delta-Check-Fehlerdetektionsprogramm kann rasche Hinweise auf Probenverwechslungen und Gerätefehlfunktionen geben.

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.1.10	Werden bei engmaschiger Kontrolle regelhaft Vorwertvergleiche des Blutbildes eines Patienten vorgenommen, um Verwechslungen oder Fehlbestimmungen aufzudecken? ¹⁷ Stellen die Gerätesoftware oder die Labor-EDV ein sog. Delta-Check-Programm zur Unterstützung bereit?			
5.5.1.11	Sind die Ober- und Untergrenzen für den Messbereich des automatisierten Verfahrens festgelegt? Ist ein Prozedere für die Überprüfung von Ergebnissen außerhalb dieser Grenzen u. bei Warnmeldungen des Zellzählgerätes festgelegt und auch in Gebrauch? ¹⁸			
5.5.1.12	Gibt es ein angemessenes System (z. B. die Überprüfung am Blutausstrich), um die Herausgabe seltener, falsch niedriger Thrombozytenwerte zu verhindern (z. B. bei Plättchenaggregaten, Riesenplättchen, Satelliten-Phänomenen)? ¹⁹			
5.5.1.13	Wird die Leukozytenzahl manuell überprüft oder wird sie mit Blutausstrich mikroskopisch überprüft, um falsch hohe Leukozytenzahlen bei Vorhandensein von Erythroblasten, Riesenplättchen und/ oder Thrombozytenaggregaten auszuschließen?			

¹⁷ Es handelt sich um eine der wichtigsten Kontrollmaßnahmen außer den Kontrollblutproben. Sie überstreicht den gesamten Prozess von der Patientenvorbereitung bis zur Postanalytik. Die zu entdeckenden Fehler können aus dem Labor stammen (Durchmischung) oder z.B. die Abnahme aus einem Infusionssystem aufdecken (gleichsinnige Verdünnung aller Zählgrößen). Umgekehrt ist intensiv-medizinisch der korrekt gemessene, isolierte (unter Umständen noch im Referenzbereich liegende) Thrombozytenabfall das früheste Zeichen einer Verbrauchskoagulopathie oder einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie oder eines Erythrozytenfragmentationssyndroms.

¹⁸ Das Laboratorium muss den Linearitätsbereich für jeden der mit automatisierten Verfahren gemessenen Analyte verifizieren. Insbesondere müssen in dem Labor Daten zur Präzision des Gerätes bei der Untersuchung von Blutproben mit Leukopenie oder Thrombozytopenie vorliegen. Thrombozytenzahlen unterhalb der festgelegten Untergrenzen müssen durch andere Methoden ermittelt bzw. bestätigt werden (z. B. Kammerzählungen oder semiquantitative Zählung auf der Grundlage von Ausstrichen). Wurde bei der erstmaligen Messung einer Probe eines Patienten oder bei einem unerwarteten Wert die Messung durch ein alternatives Verfahren bestätigt, so kann diese Überprüfung bei Folgeuntersuchungen mit geringem zeitlichen Abstand entfallen. Partikelkonzentrationen (Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten) oberhalb der festgelegten Obergrenzen müssen in der Verdünnung ermittelt werden, die minimal erforderlich ist, um die Werte in den Bereich der Linearität zu bringen.

¹⁹ Wenn ein Satelliten-Phänomen, eine signifikante Anzahl von Riesenplättchen und/oder Plättchenaggregate durch zyto/histopathische Hinweise am Gerät vermutet/entdeckt werden oder wenn die Thrombozytenzählung vom Gerät blockiert wird, müssen die Thrombozytenzahlen mit einer unabhängigen Methode verifiziert werden. Es muss eine Korrelation mit einem gut ausgestrichenen Blutausstrich hergestellt werden. Wenn sich Thrombozytenaggregate in einem EDTA-Röhrchen nach guter Durchmischung nach Abnahme finden, kann das die Folge von in vitro durch EDTA induzierte Veränderungen sein. Die Thrombozytenzahlen sollten dann durch die Blutabnahme in eine Verdünnungslösung zur Blutzellzählung oder mit einem anderen Antikoagulans (z. B. Na-Citrat-Lösung mit Korrektur für den Verdünnungsfaktor) oder durch Bestimmung aus einem Blutausstrich ohne Antikoagulans bestimmt werden.

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.1.14	Wird die Thrombozytenzahl mit einer alternativen Methode bestimmt/verifiziert, wenn eine signifikante Anzahl mikrozytärer Erythrozyten und/oder kleiner Zellfragmente vermutet oder gefunden werden? ²⁰			
5.5.1.15	Wie wurden für die hämatologischen Parameter die Referenzbereiche ermittelt? Wurden Werte aus der Literatur verwendet? Wurden diese im eigenen Labor überprüft, ausgewertet und ist dies schriftlich festgehalten?			
5.5.1.16	Werden die Funktionsüberprüfungen im Rahmen eines Überwachungsplanes so aufgezeichnet oder graphisch dargestellt, dass Instrumentenfehlfunktionen leicht erkannt werden können? ²¹			
5.5.1.17	Ist ein Regelwerk vorhanden und sind in der Software Regeln hinterlegt, die eine Warnung hervorrufen, wenn bestimmte Regeln verletzt werden? ²²			
5.5.1.18	Werden die Verdünnungen auf Trübung überprüft und gegebenenfalls geklärt, wenn die Hämoglobinbestimmung mit einer teilautomatisierten Methode unter Einschluss manueller Verdünnungen durchgeführt wird?			
5.5.1.19	Werden die Blutbildparameter in jeder Schicht des Geräteeinsatzes mit einem dokumentierten Qualitätssicherungssystem überprüft, z. B. mittels Kontrollmaterialien oder statistischer Evaluation?			
5.5.1.20	Gibt es angemessene und schriftlich festgelegte Zeitgrenzen für die Messung nach einem Verdünnungsansatz, wenn teilautomatisierte Methoden im Zusammenhang mit manuell hergestellten Verdünnungen benutzt werden? ²³			

²⁰ Wenn eine signifikante Anzahl an interferierenden Partikeln an der oberen oder unteren Volumen-/Größengrenze für die Thrombozytenzählung detektiert wird (durch Überwachung des Thrombozytenhistogramms oder durch Fehlermeldung des

Geräts), muss die Thrombozytenzahl mit einer alternativen Methode bestimmt/verifiziert werden. Solche Methoden beinhalten ein anderes Gerät, Zählkammerzählung oder die semiquantitative Zählung im Ausstrich. Die Wahl der Methode hängt von der vermuteten Anzahl Thrombozyten und von der Genauigkeit ab, die klinisch angebracht ist.

²¹ Auf diese Weise können bei großen Untersuchungsserien Geräteprobleme zwischen der Messung der Kontrollproben früher erkannt werden (Levey-Jennings-Plots).

²² Die Westergard-Regeln helfen, Fehlfunktionen zu erkennen (systematisch ansteigende oder abfallende Werte, Ausreißer). Dies kann für Kontrollmaterialien und/oder Patientenproben angewandt werden.

²³ Minimalzeiten für den Beginn der Leukozytenzählung und die Hämoglobinbestimmung sind notwendig, um eine komplette Lyse der Erythrozyten sicherzustellen. Maximale Zeitgrenzen für die Zählung von Erythrozyten und Leukozyten sollten so gesetzt werden, dass eine Lyse der Zellen nicht die Zählungen fälschlich vermindert. Die Zeitgrenzen für frische Blutproben

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.1.21	Werden alle Blutproben noch einmal vollständig unmittelbar vor der Analyse durchmischt? ²⁴			
5.5.1.22	Wie werden - lipämische, - gelierte (Kryoglobline, M. Waldenström), - agglutinierte (Kälteantikörper) oder auch - hämolytische Blutproben erkannt u. wie werden sie für die Analyse vorbereitet? Gibt es eine schriftlich festgelegte und auch in Benutzung befindliche Verfahrensweise welche Parameter ggf. gesperrt werden und durch welche Maßnahmen eine Messung gelingen kann?			

vom Menschen können für konservierte, kommerzielle Kontrollmaterialien nicht anwendbar sein.

²⁴ Proben, die mit Antikoagulanzen für hämatologische Untersuchungen abgenommen werden, müssen vollständig unmittelbar vor der Analyse erneut durchmischt werden. Es muss dokumentiert werden, dass die Durchmischung der Proben durch einen Rotationsmischer, durch eine automatisierte Probenzuführung oder eines Röhrchens von Hand ausreichend ist, um eine Reproduzierbarkeit der Zellzählungen zu gewährleisten. Einige Schüttelplattformen können ausreichen, um eine gleichmäßige Verteilung der zellulären Elemente bei vorher gut durchmischten Proben aufrechtzuerhalten, sind aber nicht in der Lage, ein sedimentiertes Probenröhrchen voll aufzumischen. Die Benutzung eines Rotationsmischers für mindestens 5 min ist empfohlen. Bei einer manuellen Durchmischung müssen mindestens 20 komplette Kippungen des Röhrchens vollführt werden. Bei Geräten mit automatischer Probenzuführung muss das Labor sicherstellen, dass die Zeit für die automatisierte Aufmischung ausreichend ist, um die Zellen in einem sedimentierten Probenröhrchen homogen aufzumischen. Die unzureichende Durchmischung der Probe bei manueller Probenzuführung ist eine der häufigsten Ursachen für Fehlbestimmungen in der Hämatologie.

5.5.2 Manuelle oder isolierte Hämoglobinbestimmung

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.2.1	Werden manuelle Hämoglobinbestimmungen für die Routinepatientenversorgung, für den Fall von Geräteausfall oder zur Kalibrierung automatischer Methoden durchgeführt?			
5.5.2.2	Wird das Verfahren mit Kalibriermaterialien, die auf den ICSH/WHO-Hämoglobinstandard zurückgeführt werden können, standardisiert?			
5.5.2.3	Werden im Rahmen der Gerätekalibrierung mindestens vier verschiedene Hämoglobinkonzentrationen benutzt, um die Kalibrierkurve zu definieren oder die Messwerte der Ausgabegeräte zu bestimmen? ²⁵			
5.5.2.4	Werden manuelle Hämoglobinverdünnungen auf Trübung überprüft und bei Bedarf geklärt, bevor die Absorption bestimmt wird? ²⁶			

5.5.3 Manuelle Hämatokrit-Bestimmung (Mikrohämatokrit, zellulärer Volumenanteil)

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.3.1	Wird die Bestimmung von Mikrohämatokrit (Zellvolumen) als Routineuntersuchung, zusätzliche Untersuchung oder zur Kalibrierung automatisierter Methoden durchgeführt?			
5.5.3.2	Wird die Geschwindigkeit der Mikrohämatokrit-Zentrifuge in festgelegten Intervallen geprüft? ²⁷			

²⁵ Die Kalibrierung eines Gerätes oder die Definition einer Bezugskurve muss mindestens 4 Hämoglobinkonzentrationen umfassen, die innerhalb, unterhalb und oberhalb der Konzentrationen liegen, die in Patientenblutproben gefunden werden. Dies soll jedoch nicht bedeuten, dass mindestens 4 verschiedene Konzentrationen für die longitudinale Prozesskontrolle notwendig sind.

²⁶ Wenn die Hämoglobinbestimmung mit einer teilautomatisierten Methode unter Einschluss manueller Verdünnungen durchgeführt wird, muss die Verdünnung auf Trübung überprüft werden und ggf. geklärt werden, bevor die Adsorption abgelesen wird. Trübung kann zu falsch hohen Hämoglobinkonzentrationen führen. Ursachen für die Trübung können Hyperlipidämie, präzipitierbare monoklonale Proteine oder nicht lysierte Erythrozyten sein. Trübung durch eine Leukozytose kann durch Zentrifugation eliminiert werden, während Trübung durch nicht lysierte Erythrozyten durch die Gabe von weiterem Lyse-Agens entfernt werden kann. Korrigierte Hämoglobinbestimmungen bei Hyperlipidämie können durch Austausch des lipämischen Plasmas durch Kochsalzlösung oder durch Subtraktion des scheinbaren „Plasmahämoglobins“ erhalten werden.

²⁷ Die relative Zentrifugalkraft sollte ausreichend sein, um eine maximale Komprimierung der Zellen zu erreichen. In den meisten Mikro-Hämatokrit-Zentrifugen mit fester Geschwindigkeit wird die relative Zentrifugalbeschleunigung einen Wert von 10.000 überschreiten. Die Mikro-Hämatokrit-Zentrifuge muss in genau definierten Intervallen mit einem Tachometer geprüft werden. Die Zentrifuge muss in der Lage sein, eine relative Zentrifugalbeschleunigung von 10.000 bis 15.000 in der Peripherie für 5 Minuten einzuhalten, ohne sich auf über 45 ° Celsius zu erhitzen.

5.5.4 Manuelle Zählung von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten im Blut

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.4.1	Führt das Labor mit manuellen (Zählkammer-) Methoden Erythrozyten-, Thrombozyten- oder Leukozytenzählungen als Routineuntersuchung, als zusätzliche Untersuchung oder zur Überprüfung oder Kalibrierung automatisierter Methoden durch?			
5.5.4.2	Werden Erythrozytenindizes (MCV, MCH, MCHC) routinemäßig berechnet, um Zufallsfehler festzustellen? ²⁸			
5.5.4.3	Sind die Blutmischpipetten – sofern verwendet – in einem brauchbaren Zustand (Spitzen nicht abgebrochen, Markierungen lesbar) und amtlich geeicht?			
5.5.4.4	Ist in der praktizierten Zählkammermethode festgelegt, dass die Zellzählung in einer höheren Zahl von Zählkammer-Quadraten durchgeführt wird, wenn eine Leukopenie oder Thrombozytopenie vorliegt?			
5.5.4.5	Wird in jeder 8-Stunden-Periode mindestens eine Kontroll-Probe gezählt oder eine prozedurale Zellzähl-Kontrolle durchgeführt?			

5.5.5 Differenzialblutbildanalyse mit automatisierten Verfahren

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.5.1	Wird für die Differenzierung von Blutzellen ein automatisiertes Differenzierungssystem (Mustererkennungs- oder Durchflusssystem) verwendet?			
5.5.5.2	Ist dokumentiert, dass das automatisierte Verfahren zur Blutzelldifferenzierung im Laboratorium validiert wurde, bevor es für Routineuntersuchungen eingesetzt wurde? ²⁹			
5.5.5.3	Beinhaltet das Verfahren der Qualitätskontrolle eine regelmäßige longitudinale Präzisionskontrolle? ³⁰			

²⁸ Siehe Fußnote 11

²⁹ Ein neues automatisiertes Differenzierungssystem (Mustererkennungs- oder Durchflusssystem) muss von dem hämatologischen Labor vor Inbetriebnahme anhand von Referenzmethoden bzw. mikroskopischen Methoden geprüft werden. Vom Labor wird nicht verlangt, die Studien des Herstellers hinsichtlich der Erkennung abnormaler Zellen zu überprüfen, obwohl eigene Untersuchungen anhand der lokalen Patientenpopulation empfehlenswert sind.

³⁰ Dabei müssen die Differenzierungen mit mikroskopisch ausgezählten Blutausstrichen oder mit Referenzmaterialien verglichen werden, die mindestens 2 Arten an Leukozyten und/oder entsprechende Ersatzpartikel enthalten. Es müssen definierte Übereinstimmungsgrenzen eingehalten werden. Es müssen definierte, dokumentierte longitudinale Kontrollen etabliert sein, um die Ergebnisse des automatisierten Verfahrens zu überwachen. Bei Mustererkennungs-Systemen (z. B. CellaVision, HemaCAM, Omron), kann dies durch regelmäßige Analyse von Kontrollausstrichen erfolgen. Bei Durchflusssystemen (z. B. Abbott, Coulter, Sysmex, Siemens) sind u. a. folgende zwei Verfahren angemessen:

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.5.4	Kann gezeigt werden, dass Korrekturmaßnahmen ergriffen wurden, wenn Toleranzgrenzen für die Kontrollpräparate oder Patientenblutproben überschritten wurden? ³¹			
5.5.5.5	Werden Erythroblasten im Befund des maschinellen Blutbildes berichtet?			
5.5.5.6	Wie werden solche i.d.R. niedrige Werte kontrolliert?			
5.5.5.5	Hat das Labor Kriterien erarbeitet zur Überprüfung von Leukozyten-Differenzialwerten, Histogrammen und/oder Blutzeldifferenzierungen, die klinisch verwendet werden? ³²			
5.5.5.6	Wie hoch ist die Rate an manuellen mikroskopischen Nachdifferenzierungen im Labor beim maschinellen Differenzialblutbild?			

5.5.6 Mikroskopische Differenzierung von Blutausstrichen (Differenzialblutbild)

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.6.1	Werden manuelle mikroskopische Differenzialblutbilder durchgeführt?			
5.5.6.2	Werden maschinelle mikroskopische Differenzialblutbilder durchgeführt? (z.B. Cellavision DM oder HemaCAM?) Wird in den Befunden kenntlich gemacht, ob es sich um ein manuelles oder maschinelles mikroskopisches Blutbild handelt? Werden diese im Befund in getrennten Zeilen dargestellt?			

- Vergleich von Differenzialblutbildern frischer Blutproben, die mit dem Zählgerät analysiert wurden, mit einem manuell ausgewerteten Differenzialblutbild, und/oder
- Verwendung von kommerziell erhältlichen stabilisierten Leukozyten und/oder Ersatz-Teilchen-Kontrollproben.

Die mit automatisierten Verfahren durchgeführten Bestimmungen und die Referenzbestimmungen sollten als manuelle Doppel-Differenzialblutbilder angesehen werden. Sie sollten mit der +/-2 oder 3 s.d.- Übereinstimmungsmethode von Rümke analysiert werden.

³¹ Wenn definierte Toleranzgrenzen für Richtigkeit und/oder Genauigkeit des automatisierten Differenzierungssystems überschritten werden, müssen Korrekturmaßnahmen ergriffen und dokumentiert werden. Die Dokumentation sollte eine Beschreibung des Problems enthalten, sowie die vermutete Ursache und eine Wiederholung der Analysen, um eine akzeptable Übereinstimmung zwischen Referenz- und Testmethode zu belegen.

³² Bestimmte Zelltypen werden im automatisierten Differenzialblutbild nur schlecht erkannt. Dazu gehören je nach Gerätetyp Monozyten, basophile Granulozyten, reaktive Lymphozyten, Erythroblasten, Myeloblasten und Blasten. Werden diese im Befund berichtet, so muss eine Übereinstimmung mit dem manuellen Differenzialblutbild gezeigt oder eine vom Gerät gemessene Erhöhung nachkontrolliert werden.

Die geübte Praxis ist kritisch zu hinterfragen.

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.6.2	Ist die Qualität der Blutausstriche zufriedenstellend (einwandfrei gefärbt, frei von Farbniederschlägen, gute Verteilung der Zellen)? ³³			
5.5.6.3	Sind die Präparate ausreichend gekennzeichnet? ³⁴			
5.5.6.4	Hat das hämatologische Labor ein definiertes, dokumentiertes System, um die Einheitlichkeit der morphologischen Beobachtungen unter allen mit der Mikroskopie von Blutausstrichen betrauten Mitarbeiter/Innen sicherzustellen? ³⁵			
5.5.6.5	Werden Blutausstriche als Referenz oder für mögliche Überprüfungen mindestens zwei Wochen aufbewahrt?			
5.5.6.6	Enthält das Laborinformationssystem eine Kommentar-möglichkeit zur Übermittlung von Freitexten zur Beurteilung der Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozyten-Morphologie (pathologische Befunde)?			
5.5.6.7	Enthält der Befundbericht eine Beurteilung der Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozyten-Morphologie (pathologische Befunde)? ³⁶			
5.5.6.8	Werden die Befunde namentlich oder mit Kürzel gekennzeichnet, was es dem Einsender erlaubt, zu dem Fall mit dem Untersucher Rücksprache zu nehmen?			

³³ Hinweis für den Gutachter: Begutachten Sie Ausstriche von mindestens drei verschiedenen Tagen und Präparate von Körperflüssigkeiten (Punktaten, Liquor) wenn solche vom Labor untersucht werden. Hinterfragen Sie Standzeiten von Färbelösungen und die fachgerechte Entsorgung. Verweisen Sie ggf. auf die publizierte Vorschrift vom Arbeitskreis Labor (Binder et al. J Lab Med 2012; 36(5): 293–309).

³⁴ Blutausstriche müssen eindeutig gekennzeichnet sein. Die Kennzeichnung von Präparaten muss folgende Angaben enthalten: eine eindeutige Proben- oder Eingangsnummer, Patientennamen und/oder Patientennummer und das Datum der Anfertigung.

³⁵ Das hämatologische Labor muss ein schriftlich niedergelegtes System haben, welches sicherstellt, dass das gesamte Personal die Morphologie der untersuchten Proben in ähnlicher Weise bewertet und befundet. Für die Richtigkeit der ersten Probe sowie für die Beständigkeit bei weiteren Proben desselben Patienten muss das Labor dokumentieren können, dass hinsichtlich der morphologischen Klassifikation unter allen Mitarbeiter/Innen Übereinstimmung herrscht.
Methoden, um dies zu erreichen, sind unter anderem:

1. Umlauf von Blutausstrichen mit definierter Verteilung der differenzierten Leukozyten und mit spezifischen qualitativen Normabweichungen in jeder Zell-Kategorie (Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten), und/oder
2. Mikroskopie mit Teaching-Anlage, und/oder
3. Verwendung von Blut- oder Knochenmark-Mikrophotographien mit vorliegender Experten- oder Konsensusbeurteilung.
4. Vergleichende Differenzierung der Ringversuchspräparate

³⁶ Siehe auch Baurmann H et al., Lymphozytenmorphologie im Blutausstrich – Vorstellung einer überarbeiteten Nomenklatur und Systematik, J Lab Med 2011;35(5)

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.6.9	Wird eine Angabe darüber gemacht, ob eine ausreichende Plättchenzahl vorliegt, wenn kein quantitatives Ergebnis einer automatisierten oder Zählkammer-Thrombozytenzählung vorliegt (z.B. bei Aggregationsphänomenen)?			
5.5.6.10	Werden Erythroblasten erkannt und außerhalb der 100% Leukozyten angegeben?			
5.5.6.11	Werden Kernschatten erfasst und in die 100% Leukozyten einbezogen?			
5.5.6.12	Gibt es eine schriftlich festgelegte und auch in Benutzung befindliche Verfahrensweise, wie bei Einsatz eines automatisierten Mikroskops die vom Gerät nicht erkannten, pathognomonischen morphologischen Besonderheiten von Blutzellen nachuntersucht werden? ³⁷			
5.5.6.13	Gibt es schriftlich fixierte Kriterien, nach denen bestimmte Befunde der Blutausstriche vom Hämatologen oder von anderem Fachpersonal mit der entsprechenden Qualifikation in hämatologischer Zytomorphologie überprüft werden müssen, und kann gezeigt werden, dass solche Überprüfungen stattgefunden haben?			
5.5.6.14	Ist eine Sammlung von pathologischen Ausstrichen angelegt worden und sind hämatologisch-zytologische Atlanten am Arbeitsplatz verfügbar?			

5.5.7 Automatisierte Retikulozytenbestimmung

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.7.1	Wird die automatische quantitative Retikulozytenbestimmung mittels Durchflusszytometrie oder mit einem Mustererkennungssystem durchgeführt?			
5.5.7.2	Gibt es vor Ort eine Vorschrift zur Bestimmung der Stärke und Stabilität des Farbstoffes, der für die quantitative Retikulozytenbestimmung mittels Durchflusszytometrie verwendet wird? ³⁸			

³⁷ Derzeit eingesetzte Systeme sind auf die Analyse von Leukozyten ausgerichtet. Atypische Zellen (z.B. Blasten) können nur z.T. erkannt werden. Pathologische Erythrozytenformen oder Thrombozytenaggregate werden derzeit nicht erkannt. Ist die vom System angebotene Erythrozytenmenge ausreichend, um seltene Zellen wie Sichelzellen oder Fragmentozyten zu finden? Die geübte Praxis ist vom Gutachter kritisch zu hinterfragen.

³⁸ Bei Testkits bzw. OnBoard-Reagenzien der Hämatologiegeräte kann es bei längerer Standzeit oder inadäquater Lagerung zu einem Verlust der Intensität der Färbung kommen, die angesichts der kontinuierlichen Verteilung der RNA-Intensität zu einer falsch niedrigen Retikulozytenzahl führt, die mit Kontrollmaterial welches artifizielle Retikulozyten mit hohem Nukleinsäure-Gehalt beinhaltet, zunächst nicht erkannt wird.

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.7.3	Sind dem Labor die Unterschiede zwischen den künstlichen Retikulozyten im Kontrollmaterial und den physiologischen Retikulozyten im Blut bekannt? ³⁹			
5.5.7.4	Gibt es vor Ort ein Programm zur Qualitätskontrolle, um die Reproduzierbarkeit (Präzision) und Richtigkeit der quantitativen Retikulozytenbestimmung festzustellen?			
5.5.7.5	Gibt es schriftlich niedergelegte Kriterien für die Identifizierung von Proben, bei denen die automatisierte Zählung fehlerhafte Ergebnisse liefern könnte? ⁴⁰			
5.5.7.6	Ist die Methode in der Lage, verminderte Retikulozytenzahlen zu messen und gibt es hierfür eine geeignete Kontrolle? ⁴¹			

5.5.8 Manuelle Retikulozytenbestimmung

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.8.1	Werden Retikulozytenzahlen durch Mikroskopie erstellt?			
5.5.8.2	Ist die Qualität der Ausstriche für die Retikulozytenbestimmung zufriedenstellend? Ist die Substantia Retikulofilamentosa (netzförmig präzipitierte RNA) ausreichend intensiv gefärbt?			
5.5.8.3	Sind die Objektträger gut gereinigt (entfettet) zur Vermeidung einer Inselbildung zwischen den Erythrozyten? ⁴²			

³⁹ Dem Kontrollmaterial aus stabilisierten Erythrozyten werden solche beigemischt, denen aus Gründen der Instabilität der RNA natürlicher Retikulozyten DNA z.B. durch Elektroporation hinzugefügt wurde. Diese lassen sich vom Gerät leicht erkennen und abgrenzen, während die kontinuierliche RNA-Verteilung insbesondere bei alterndem Farbstoff bei echten Retikulozyten schwerer abzugrenzen ist. Auf diese Weise kann bei noch erfolgreicher interner Qualitätskontrolle dennoch zu Problemen im Ringversuch kommen, wenn dort natürliche Retikulozyten versandt werden. Werden fixierte natürliche Retikulozyten eingesetzt, kann es zum Verlust von Retikulozyten mit geringem RNA-Gehalt kommen (sog. Ein-Dot oder Zwei-Dot Retikulozyten).

⁴⁰ Da alle Zellen, die DNA und RNA enthalten, von DNA-RNA-Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt werden, muss es ein etabliertes Verfahren geben, um Fehler durch solche Phänomene auszuschließen. Mögliche Störungen können u. a. verursacht werden durch: Howell-Jolly-Körper, kernhaltige Erythrozyten, Heinz'sche Innenkörper, basophile Tüpfelung der Erythrozyten, Riesen-thrombozyten, Megakaryozyten-Fragmente, Plättchen-Aggregate, sowie Malaria oder andere intrazelluläre Parasiten. Erythrozytenagglutination kann, ebenso wie ausgeprägte Leukozytose oder Thrombozytose, auch zu fälschlich hohen Ergebnissen führen. Es gibt unterschiedliche störende Partikel, abhängig von den Gerätschaften, den Färbelösungen und den Reaktionsbedingungen. Basierend auf der initial durchgeführten Überprüfung des Gerätes durch das Labor müssen Kriterien entwickelt werden, nach denen Proben mit potenziell fehlerhaften Ergebnissen erkannt werden. Dies kann erreicht werden durch einen Markierungs-Algorithmus im Gerät selbst und durch Untersuchung eines Blutausstriches von jeder Probe, um das Vorhandensein relevanter Störungen auszuschließen.

⁴¹ Erhöhte Retikulozytenzahlen können auf eine hämolytische und verminderte auf eine aplastische Anämie hinweisen. Absorptionsmethoden sind z. T.: nicht in der Lage verminderte Retikulozyten zu messen.

⁴² Ungereinigte Objektträger führen zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Erythrozyten („Inselbildung“) durch die

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.8.4	Basiert die ermittelte Retikulozytenzahl auf einer Probe mit mindestens 1.000 Erythrozyten und wird für die Auszählung die Verwendung eines Hilfsgitters vor-geschrieben? ⁴³			
5.5.8.5	Wird regelmäßig und erfolgreich an Ringversuchen für die <u>manuelle</u> Retikulozytenzählung teilgenommen?			

5.5.9 Knochenmarkpräparate

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.9.1	Werden Knochenmarkpräparate angefertigt und untersucht?			
5.5.9.2	Werden die Knochenmarkausstriche einwandfrei gekennzeichnet? ⁴⁴			
5.5.9.3	Sind Aufbereitung und Färbung der Knochenmark-ausstriche ausreichend für eine Beurteilung? ⁴⁵			
5.5.9.4	Werden Knochenmarkbiopsieschnitte zusätzlich zu den Aspiraten begutachtet?			
5.5.9.5	Ist die Qualität der histologischen Knochenmarkpräparate ausreichend, um zu einer verlässlichen Diagnose zu kommen?			
5.5.9.6	Wenn histologische Schnitte und Ausstriche von Knochenmarkspiraten in verschiedenen Bereichen des Labors beurteilt werden, gibt es eine Verfahrensweise, um die Daten und Beurteilungen dieser unterschiedlichen Gebiete abzustimmen, bevor die Befunde herausgegeben werden?			
5.5.9.7	Werden Knochenmarkbefunde und -ausstriche 10 Jahre aufbewahrt? ⁴⁶			

physikochemischen Eigenschaften der wässrigen Suspension der gefärbten, verdünnten Blutprobe, so dass die Annahme einer gleichen Erythrozytenzahl pro Gesichtsfeld nicht mehr gegeben ist.

Hinweis für den Begutachter: Inspizieren Sie mindestens einen Ausstrich.

⁴³ Ein Hilfsgitter i.S. eines Miller-Okulars erleichtert die Auszählung der Erythrozyten und das Ausblenden der unscharfen Randbereiche des Gesichtsfeldes zur sicheren Erkennung der Retikulozyten.

⁴⁴ Knochenmarkausstriche müssen ausreichend gekennzeichnet sein. Die Kennzeichnung auf dem Objektträger muss eine eindeutige Proben- oder Eingangsnummer, den Patientennamen und/oder die Patientennummer sowie das Datum enthalten.

⁴⁵ Hinweis für den Begutachter: Inspizieren Sie mindestens einen Ausstrich.

⁴⁶ Beim Aufstellen der Richtlinien für die Archivierung sollte auf Übereinstimmung mit den Regelungen von Bund und Ländern geachtet werden.

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.9.8	Werden Knochenmarkpräparate von Hämatologen oder Ärzten vergleichbarer Qualifikation beurteilt und werden schriftliche Befunde erstellt? Enthalten diese Befunde die klinische Fragestellung?			
5.5.9.9	Wird bei Knochenmarkbeurteilung von Anämien eine Eisenfärbung angefertigt?			
5.5.9.10	Stehen dem Befunder die Ergebnisse anderer Untersuchungsmethoden (Immunphänotypisierung, Molekulargenetik, Histologie) zur Verfügung?			
5.5.9.11	Sind die folgenden verwendeten Spezialfärbungen von guter Qualität und veranschaulichen sie die Zellcharakteristika, für die sie eingesetzt werden? <ul style="list-style-type: none"> - May-Grünwald Giemsa - Unspezifische Esterase - Myeloperoxidase - Eisenfärbung 			
5.5.9.12	Wird die gewünschte Reaktivität der Färbungen am Tag ihres Einsatzes durch paralleles Anfärben von Kontrollpräparaten überprüft? ⁴⁷			
5.5.9.13	Liegt eine Fremdbeurteilung der Ausstrich- und Färbegüte für die o.g. Färbungen vor?			
5.5.9.14	Hat das Labor ein definiertes u. dokumentiertes System, mit dem die Einheitlichkeit in der morphologischen Beurteilung bei allen Personen sichergestellt wird, die Differenzierungen von Zellen aus Knochenmarkpräparaten durchführen? ⁴⁸			
5.5.9.15	Nehmen die Untersucher dieser Präparate regelmäßig und erfolgreich <ul style="list-style-type: none"> a) an Ringversuchen und b) an Fortbildungen für die Beurteilung solcher Präparate teil? 			

⁴⁷ Wenn möglich, müssen parallel zu allen Spezialfärbungen Kontrolluntersuchungen durchgeführt werden. Die Standardarbeitsanweisung sollte die Festlegung beinhalten, dass eine Bewertung der Färbung der restlichen normalen Zellen auf dem Testausstrich bzw. der Färbung von Zellen auf einem normalen Kontrollausstrich durchgeführt werden muss. Wird es versäumt, die zu erwartenden Reaktionen an normalen Zellen zu überprüfen, können Fehler in der Diagnostik die Folge sein.

⁴⁸ Fußnote 29 gilt sinntensprechend.

5.5.10 Zählung von Zellen in extravaskulären Körperflüssigkeiten

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.10.1	Werden Zellzählungen von Körperflüssigkeiten (z. B. Liquor, Pleura-, Peritoneal-, Perikard-, Synovialflüssigkeit) manuell mit der Zählkammer durchgeführt?			
5.5.10.2	Ist gewährleistet, dass die Zellzählung unmittelbar nach der Entnahme durchgeführt wird? ⁴⁹			
5.5.10.3	Werden - Blutmischpipetten oder - kommerzielle Verdünnungssysteme beim Verdünnen von Körperflüssigkeitsproben verwendet? ⁵⁰			
5.5.10.3	Sind die Blutmischpipetten in einem ordnungsgemäßen Zustand (Spitzen unbeschädigt, zulässige Graduierung etc.)?			
5.5.10.4	Vermerkt das Labor im Befund, dass Ergebnisse evtl. unpräzise sind z. B. durch das Auftreten von Gerinnseln im Material oder Debris in der Zählkammer?			
5.5.10.5	Ist bei der Zählkammermethode gewährleistet, dass Erythrozyten sicher von anderen Zellen unterschieden werden können (z. B. Methylenblau, Lysierverfahren oder Phasenkontrast-mikroskopie)?			
5.5.10.6	Werden Zellzählungen von Körperflüssigkeiten (Liquor, Pleura-, Perikarderguss, Peritoneal-, und Synovialflüssigkeit) mit automatisierten oder teilautomatisierten Zellzählgeräten vorgenommen?			
5.5.10.7	Werden Leerwertmessungen am Gerät mit der Verdünnungsflüssigkeit und dem Lysereagenz durchgeführt, um eine evtl. Kontamination, die die Zellzählung beeinflussen könnte, auszuschließen?			
5.5.10.8	Hat das Labor untere Grenzen für die Zählung von Zellen (Erythrozyten, kernhaltige Zellen) in Körperflüssigkeiten definiert, bei deren Unterschreitung die Benutzung von voll- oder teilautomatisierten Zählgeräten nicht mehr möglich ist? ⁵¹			

⁴⁹ Leukozyten sind in Punktaten, insbesondere in nativem Liquor und Lymphknoten nur wenig haltbar (<<2 Stunden). Alternativ können Stabilisierungslösungen verwendet werden, die jedoch eine Reihe von anderen Bestimmungen stören können.

⁵⁰ Pipetten und Verdünnungssysteme, die für die manuelle Zellzählung verwendet werden, müssen eine dem Stand der Technik entsprechende Genauigkeit aufweisen (vgl. z. B. DIN 12750 für Blutmischpipetten).

⁵¹ Im Bereich von <100 Leukozyten/ μ l haben normale Hämatologieanalytoren Probleme v.a. Zellkonzentrationen im Liquor zu bestimmen.

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.10.9	Werden Körperflüssigkeitsproben sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch auf das Vorhandensein von Zellklumpen, die eine falsch niedrige Zellzahl im System hervorrufen würden, oder Debris, der zu einer zu hohen Zellzahl führen würde, untersucht?			

5.5.11 Differenzierung von kernhaltigen Zellen in extravaskulären Körperflüssigkeiten

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.11.1	Werden Differenzierungen der kernhaltigen Zellen in Körperflüssigkeiten vorgenommen (Leukozyten, Mesothelzellen, Tumorzellen etc.)?			
5.5.11.2	Werden für quantitative Differenzierungen immer gefärbte Ausstriche verwendet?			
5.5.11.3	Sind die Objektträger eindeutig und gut lesbar gekennzeichnet? Besteht ein Archivierungssystem, welches ein jederzeitiges Auffinden und eine Zuordnung erlaubt? ⁵²			
5.5.11.4	Wird eine geeignete zellanreichernde Methode (Zytozentrifuge oder Sedimentation mit Anfertigung von Quetschpräparaten) benutzt? ⁵³			
5.5.11.5	Sind die folgenden verwendeten Spezialfärbungen von guter Qualität und veranschaulichen sie die Zellcharakteristika, für die sie eingesetzt wurden? <ul style="list-style-type: none"> - May-Grünwald Giemsa-Färbung - Papanicolau-Färbung - Gramfärbung - Eisenfärbung 			

⁵² Bei Punktaten werden pro Patient oft mehrere Lokalisationen untersucht (z.B. Lymphknotenstationen, links- oder rechtsseitige Abnahme), so dass neben der Patientenzuordnung auch eine Materialzuordnung sichergestellt sein muss.

⁵³ Das Labor sollte gefärbte Präparate benutzen, um die Differenzierung der kernhaltigen Zellen aus Körperflüssigkeiten zu erleichtern. Differenzierungen, die auf ungefärbten oder supravital gefärbten Zellsuspensionen bei der Kammerzählung oder auf

Präparationen aus Tropfen beruhen, werden als unzureichend betrachtet. Präparationen mit Anreicherung (Zytozentrifuge oder Sedimentation --> Quetschpräparat wie Knochenmark) sind reproduzierbarer und führen zu Präparaten, in denen die verschiedenen Zelltypen sicherer zu unterscheiden sind; sie ergeben gute morphologische Details, führen zu einer höheren Ausbeute

an Zellen auch bei niedrigen Zellzahlen und erleichtern die Erkennung maligner Zellen. Im Falle von Leukämien oder Lymphomen ergeben nach Pappenheim gefärbte Präparate eine ausgezeichnete Korrelation mit der Morphologie des peripheren Bluts oder Knochenmarks.

Die Präparate müssen eindeutig beschriftet, sachgerecht gelagert u. den Vorschriften entsprechend lange aufbewahrt werden.

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.11.6	Wird die gewünschte Reaktivität der Färbungen am Tag ihres Einsatzes durch paralleles Anfärben von Kontrollpräparaten überprüft? ⁵⁴			
5.5.11.7	Ist die Qualität der Ausstriche ausreichend (gleichmäßige Zellverteilung, richtige Zelldichte, Ausbreitung der Zellen, gute Färbung, eindeutige Zellidentifizierung)? ⁵⁵			
5.5.11.8	Hat das Labor ein definiertes und dokumentiertes System, mit dem die Einheitlichkeit in der morphologischen Beurteilung bei allen Personen sichergestellt wird, die Differenzierungen von Zellen aus Körperflüssigkeiten durchführen? ⁵⁶			
5.5.11.9	Werden Ausstriche mit Verdacht auf maligne Zellen von einem Pathologen, Hämatologen, Zytologen oder einem anderen erfahrenen Arzt mit vergleichbarer Qualifikation überprüft, bevor ein endgültiger Befund erstellt wird?			
5.5.11.10	Werden Befunde und Beurteilungen abgestimmt, falls Proben einer Körperflüssigkeit in mehreren Bereichen eines Labors untersucht werden, insbesondere wenn die Diagnose eines Malignoms erwogen wird?			
5.5.11.11	Wird eine Gramfärbung vorgehalten, insbesondere für die Untersuchung von gramnegativen Diplokokken in Liquorpräparaten? Werden Befunde und Beurteilungen mit einem Mikrobiologen oder Laborarzt abgestimmt, falls Proben einer Körperflüssigkeit in mehreren Bereichen eines Labors untersucht werden, insbesondere wenn die Diagnose einer Infektion erwogen wird? Erfolgt bei der Feststellung von gramnegativen Diplokokken eine Meldung an das Gesundheitsamt und wird eine Bestätigungsdiagnostik eingeleitet?			
5.5.11.12	Werden Ausstrichpräparate für zukünftige Vergleiche aufbewahrt? ⁵⁷			

⁵⁴ Wenn möglich, müssen parallel zu allen Spezialfärbungen Kontrolluntersuchungen durchgeführt werden. Die Standardarbeitsanweisung sollte die Festlegung beinhalten, dass eine Bewertung der Färbung der restlichen normalen Zellen auf dem Testausstrich bzw. der Färbung von Zellen auf einem normalen Kontrollausstrich durchgeführt werden muss. Wird es versäumt, die zu erwartenden Reaktionen an normalen Zellen zu überprüfen, können Fehler in der Diagnostik die Folge sein.

⁵⁵ Hinweis für den Begutachter: Beurteilen Sie mindestens einen Ausstrich einer Körperflüssigkeit.

⁵⁶ Fußnote 29 gilt sinnessprechend.

⁵⁷ Alle Ausstriche von Körperflüssigkeiten sollten mindestens fünf Jahre aufbewahrt werden (sofern nicht andere Regelungen andere Fristen vorschreiben), davon eine Woche im unmittelbaren Zugriff für eine eventuelle Überprüfung oder Referenzuntersuchung. Ausstriche mit bedeutsamen pathologischen Befunden (z. B. die, in denen Mikroorganismen, zytologisch suspekten oder offensichtlich maligne Zellen etc. gefunden wurden) sollten für Demonstrationszwecke verfügbar sein.

5.5.12 Malariadiagnostik

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.12.1	Werden im Laboratorium Untersuchungen auf Plasmodium sp. durchgeführt?			
5.5.12.2	Werden für die Malariadiagnostik immer „Dicke Tropfen“ und/oder dünne Ausstriche angefertigt und beurteilt? ⁵⁸			
5.5.12.3	Ist die Qualität der dünnen Blutausstriche/ Dicken Tropfen zufriedenstellend (einwandfrei gefärbt, frei von Farbniederschlägen, gute Verteilung der Zellen)? ⁵⁹			
5.5.12.4	Werden mehrere gefärbte und ungefärbte, luftgetrocknete Präparate angefertigt? ⁵⁹			
5.5.12.5	Sind die Präparate ausreichend gekennzeichnet? ⁶⁰			
5.5.12.6	Werden im „dicken Tropfen“ mindestens 150 Gesichtsfelder und im dünnen Ausstrich mindestens 200 Gesichtsfelder durchgesehen (Ölimmersion, 800-1000-fache Vergrößerung)? ⁶¹			
5.5.12.7	Wird bei negativem Untersuchungsergebnis und fortbestehendem klinischem Verdacht innerhalb von 24 Stunden eine zweite Probe untersucht? Werden fragliche Präparate von einem zweiten Untersucher durchgemustert?			
5.5.12.8	Wird bei einem positiven Untersuchungsbefund immer eine Artdiagnostik angeschlossen? ⁶²			

⁵⁸ Der mikroskopische Nachweis und Differenzierung der Plasmodien Speziesbestimmung kann sowohl im „Dicken Tropfen“, als auch im dünnen Blutausstrich erfolgen. Der Dicke Tropfen setzt eine entsprechende Erfahrung voraus, so dass im weniger geübten Labor der alleinigen Diagnostik in dünnen Blutausstrichen durchaus der Vorzug gegeben werden kann. Der Dicke Tropfen hat den Vorteil der 20-40 fachen Anreicherung der Parasiten pro Gesichtsfeld. Die Anfertigung eines dicken Tropfens setzt aber eine entsprechende Übung der Technik voraus. Eine Artdiagnostik ist im „Dicken Tropfen“, durch die veränderte Form der Parasiten ebenfalls nur durch den Geübten möglich. Da die Malaria-Diagnostik in vielen Laboren nur gelegentlich erfolgt, fehlt den einzelnen MTLA oft die entsprechende Erfahrung. Die Technik der dünnen Ausstriche ist aber meist vom mikroskopischen Differenzialblutbild bekannt. Sowohl die „Dicke Tropfen“, als auch die dünnen Blutausstriche können sowohl aus Kapillarblut, als auch aus antikoaguliertem Venenblut (EDTA) angefertigt werden.

⁵⁹ Grundsätzlich hebt die korrekt durchgeführte einfache Giemsa-Färbung die Plasmodien besser hervor, als andere Färbemethoden. Jedoch können grundsätzlich auch andere Färbemethoden (May-Grünwald-Giemsa oder fertige Schnellfärbungen, z.B. Diff Quick®) eingesetzt werden. Da die Qualität der Färbung und die Beurteilung der Ausstriche auch von der Häufigkeit der Anwendung einer Färbung abhängt, wird das Labor, dass die Malariadiagnostik nur selten durchführt im Zweifel mit der aus der Routinediagnostik gewohnten Färbung besser zurecht kommen.

⁶⁰ Siehe 5.5.6.3

⁶¹ Die Anzahl der Gesichtsfelder beruht auf der Zahl der zu inspizierenden Erythrozyten. Der sog. „Dicke Tropfen“ bewirkt eine ca. 20-fache Anreicherung gegenüber dem normalen Blutausstrich. Da eine Artdiagnostik aus dem dicken Tropfen schwieriger ist, werden beiden Präparate hergestellt.

⁶² Eine Speziesdifferenzierung ist für eine korrekte Therapie der verschiedenen Malariaformen unerlässlich. Sollte das Laboratorium diese nicht selbst erbringen können, sollte ein Prozedere festgelegt sein, dass eine Artdiagnostik ohne Zeitverlust in einem Referenzinstitut ermöglicht.

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.12.9	Werden Blutausstriche als Referenz oder für mögliche Überprüfungen mindestens sechs Monate aufbewahrt? ⁶³			
5.5.12.10	Wird die Vorgeschichte des Patienten in die Beurteilung einbezogen und in den ärztlichen Befundbericht eingebunden? ⁶⁴			
5.5.12.11	Wird bei einem negativen Ergebnis darauf hingewiesen, dass dieses Ergebnis eine Erkrankung nicht ausschließt? Werden bei einem starken Verdacht Folgeuntersuchungen im Abstand von 12-24 Stunden unabhängig vom Fieberanstieg empfohlen? ⁶⁵			
5.5.12.13	Wird im Befundbericht die Parasitendichte als Parasitenzahl/µl oder prozentualer Anteil der infizierten Erythrozyten der gezählten Erythrozyten angegeben?			
5.5.12.14	Nimmt das Laboratorium an Ringversuchen für die Malaria-diagnostik teil?			
5.5.12.15	Setzt das Laboratorium weitere Methoden in der Malaria-diagnostik ein?			
5.5.12.16	Werden so genannte Malariaschnellteste (Immunchromatischer Nachweis von Plasmodien-spezifischen Proteinen) ergänzend eingesetzt? ⁶⁶			

⁶³ Da die Malaria grundsätzlich mit zeitlicher Latenz auftreten kann und bei nicht nachbehandelten Malaria tertiana Re-kurrenzen auftreten können, sollten die Präparate der Malaria-Diagnostik grundsätzlich länger aufbewahrt werden, als normale Blut-ausstriche, damit eine Nachbeurteilung möglich ist. Da die Malariadiagnostik immer schnellstmöglich erfolgen sollte, kann bei einem missglückten Präparat schnell auf ein weiteres zurückgegriffen werden. Weiterhin stehen damit auch Präparate für den Versand an ein Referenzinstitut zur Verfügung.

⁶⁴ Eine genaue Kenntnis der Vorgeschichte ist auch für den Laborarzt für die korrekte Diagnosestellung wichtig. Weitere Labor-ergebnisse (z.B. Thrombozytenzahl, Retikulozyten, LDH) des Patienten sollten in die Beurteilung einbezogen und in den ärztlichen Befundbericht eingebunden werden. Die Diagnosewahrscheinlichkeit und die Artdiagnose hängen stark von der Vor-geschichte ab (Reiseziel, Zeitpunkt der Erkrankung nach Aufenthalt in Endemiegebiet, Prophylaxemaßnahmen, Vortherapie, vorherige Malariainfektionen, mögliche (Teil-)Immunität). Medikamente, wie Antibiotika können die Morphologie der Parasiten beeinflussen. Weitere Details siehe AWMF Leitlinie Nr. 042/001.

⁶⁵ Zu Erkrankungsbeginn kann der Parasitenbefall so gering sein, dass ein Nachweis auch dem geübten Untersucher nicht gelingt. Plasmodien können grundsätzlich unabhängig vom Fieberanstieg nachgewiesen werden, so dass sich eine Wiederholung der Untersuchung in festen Abständen, als klare Anweisung anbietet.

⁶⁶ Immunchromatographische Antigennachweise können sowohl falsch-positive, wie falsch negative Ergebnisse liefern. Falsch-positive Ergebnisse wurden bei einzelnen Testsystemen z.B. vorliegen von Rheumafaktoren beobachtet. Falsch-negative Ergebnisse wurden u.a. bei sehr hoher Parasitendichte oder bei fehlerhafter Durchführung beschrieben. Letzteres wurde auch bei Fachpersonal beobachtet, sofern diese Tests nur sehr selten durchgeführt werden. Falsch-negative Ergebnisse, insbesondere bei sehr hoher Parasitendichte können schnell zu einem fatalen Ausgang der Erkrankung führen. Gerade in diesen Fällen sollte aber auch dem ungeübten, der Erregernachweis im Blutaussstrich gelingen.

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.12.17	Sind dem Laboratorium die Stärken und Schwächen dieser Schnellteste sowie die unterschiedlichen Halbwertszeiten des jeweils nachgewiesenen Antigens und deren Bedeutung für die Interpretation der Ergebnisse bekannt? ⁶⁷			
5.5.12.18	Wird der Parasitennachweis mittels moderner automatischer Blutbildanalysensysteme allenfalls ergänzend eingesetzt? Werden über Regelwerke mögliche Zufallsbefunde erhoben und dann mikroskopisch abgeklärt? ⁶⁸			
5.5.12.19	Setzt das Laboratorium spezielle Methoden (z.B. QBC-Methode, PCR) in der Malariadiagnostik ein, wird hierfür auf entsprechende Checklisten der Parasitologie verwiesen. Entsprechendes gilt für den regelmäßigen Nachweis anderer Blut- und Knochenmarksparasiten.			
5.5.12.20	Erfolgt bei positivem Erregernachweis eine Meldung an das Robert-Koch-Institut in Berlin? Sind die vorgeschriebenen, vordruckierten Meldebögen des RKI im Labor vorhanden? ⁶⁹			
5.5.12.21	Ist das Labor auch in der Lage, andere Blutparasiten zu erkennen? ⁷⁰			

5.5.13 Nachweis abnormaler Hämoglobine

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.13.1	Werden im Labor Hämoglobinphänotypen durch... - Elektrophorese in alkalischem und saurem Milieu, - isoelektrische Fokussierung - HPLC und/oder - Sichelzell-Test nachgewiesen?			

⁶⁷ Die in den immunochromatographischen Testsystemen nachgewiesenen Proteine, z.B. Plasmodium falciparum histidine rich protein 2 (PfHRP-2) oder parasitenspezifische Laktatdehydrogenase (pLDH) können unterschiedlich lange nachgewiesen werden. Bei PfHRP-2 kann der Nachweis u.U. auch noch 2 Wochen nach erfolgreicher Therapie gelingen und darf dann nicht als Therapieversagen gewertet werden. Der Therapieerfolg sollte daher nur im Ausstrich beurteilt werden.

⁶⁸ Die Möglichkeiten auch moderner, automatischer Blutbildanalysensysteme Malariaerreger nachzuweisen sind noch sehr begrenzt. Auch wenn einzelne Systeme gute Trefferquoten bei einem hohen Parasitenbefall erreichen, sind die Sensitivitäten für eine gezielte Diagnostik noch zu gering.

⁶⁹ Das Infektionsschutzgesetz schreibt eine getrennte Meldepflicht für Labor und behandelnden Arzt vor.

⁷⁰ Die morphologische Arterkennung bei Plasmodien ist nicht einfach. Z.B. können Babesien, Borrelien, Trypanosomen, Bartonella und Ehrlichea Plasmodien zum Verwechseln ähnlich aussehen. Eine Bestätigungsdagnostik in einem Referenzlabor ist unbedingt zu empfehlen. Differenzialdiagnostisch kommen bei Auslandsanamnese auch Filariosen in Betracht, die eine Durchmusterung des Blutausstrichs bei geringer Vergrößerung verlangen (Loa loa, Wucheria bancrofti, Onchocerca volvulus, Mansonella streptocercus, Brugia malayi, Brugia timori). Siehe bench aids der WHO. Bei der Suche nach einem Leishmania-befall des Knochenmarks müssen für die Diagnostik ausreichend Makrophagen (Bröckel) im Präparat vorhanden sein.

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.13.2	Sind bei gefärbten Elektrophoresen Kontrollen unter Einschluss von mindestens 3 der wichtigsten bekannten Hämoglobine (z. B. A, F, und S) zusammen mit den Patientenblutproben auf-getragen und sind die Auflösungen zufriedenstellend? ⁷¹			
5.5.13.3	Werden alle Proben, bei denen sich Hämoglobin in einer „non-A“-Position bei Elektrophorese im alkalischen Milieu oder bei isoelektrischer Fokussierung darstellt, weiter untersucht durch eine Elektrophorese bei saurem pH, durch HPLC oder durch andere Methoden?			
5.5.13.4	Werden in jeder Serie zusammen mit den Patientenblutproben bekannte Positiv-(HbS)- und Negativ-(non-HbS)-Kontrollen untersucht? ⁷²			
5.5.13.5	Beinhaltet die Standardarbeitsanweisung für die Methode adäquate Kontrollen, Normalbereiche und Vorlagen für die Befunderstellung?			
5.5.13.6	Werden Löslichkeitstests durchgeführt oder monoklonale Antikörper Tests für das Vorliegen von Sichelzell-Hämoglobin verwendet?			
5.5.13.7	Werden in jeder Serie zusammen mit den Patientenblutproben bekannte Positiv-(HbS)- und Negativ-(non-HbS)-Kontrollen untersucht? ⁷³			
5.5.13.8	Wird bei jedem Patienten mit V.a. Sichelzell-Anämie ein mikroskopischer Sichelzell-Test angefertigt? ⁷⁴			
5.5.13.9	Werden bei jedem Sichelzell-Test Kontrollen angefertigt? ⁷⁵			
5.5.13.10	Werden die Ergebnisse der verschiedenen Sichelzell-Untersuchungen (HPLC, Elektrophorese, Mikroskopie) synoptisch verglichen?			

⁷¹ Hinweis für den Begutachter: Inspizieren Sie eine gefärbte Elektrophorese (Zelluloseacetatfolie, Zitratagar oder isoelektrische Fokussierung).

⁷² Bekannte Positiv-(HbS)- und Negativ-Kontrollen (non-HbS) müssen in jeder Serie, in der Patientenblutproben auf HbS getestet werden, mitgeführt werden. Diese Tests sind strikt zu verbinden mit anderen Methoden wie Elektrophorese, isoelektrische Fokussierung oder HPLC. Löslichkeitstests allein sind für die Erkennung oder Klassifikation des Hämoglobinphänotyps nicht ausreichend.

⁷³ Bekannte Positiv-(HbS)- und Negativ-Kontrollen (non-HbS) müssen in jeder Serie, in der Patientenblutproben auf HbS getestet werden, mitgeführt werden. Diese Tests sind strikt zu verbinden mit anderen Methoden wie Elektrophorese, isoelektrische Fokussierung oder HPLC. Löslichkeitstests allein sind für die Erkennung oder Klassifikation des Hämoglobinphänotyps nicht ausreichend

⁷⁴ Bekannte Positiv-(HbS)- und Negativ-Kontrollen (non-HbS) müssen in jeder Serie, in der Patientenblutproben auf HbS getestet werden, mitgeführt werden. Diese Tests sind strikt zu verbinden mit anderen Methoden wie Elektrophorese, isoelektrische Fokussierung oder HPLC. Löslichkeitstests allein sind für die Erkennung oder Klassifikation des Hämoglobinphänotyps nicht ausreichend

⁷⁵ Das Phänomen des Sichelns der Erythrozyten durch präzipitierendes (kristallisierendes) HbS tritt beschleunigt durch Sauerstoffverarmung unter Luftabschluss und Zugabe von Natrium-Di-Thionit auf (Phasenkontrast-Mikroskopie). Durch Verfall des Na-Di-Thionit (z.B. offene Flasche) kann der Test falsch negativ werden (cave heterozygote Patienten). Stechapfelformen (falsche Osmolarität) müssen durch Vergleich mit Blut gesunder Kontrollpersonen ausgeschlossen werden.

5.5.14 Erythrozytenmembran-Diagnostik

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.14.1	Werden spezielle Methoden (osmotische Resistenz, 5-EMA-Test, Sequenzierung) im Labor zur Diagnostik einer Sphärozytose eingesetzt?			
5.5.14.2	Werden der osmotische Resistenz-Test aus Heparinblut und der 5-EMA-Test aus EDTA-Blut angesetzt?			
5.5.14.3	Werden die zytometrischen Messergebnisse des Patienten mit denen von mindestens fünf Normalpersonen verglichen (5-EMA-Test)?			
5.5.14.3	Ist die Streubreite der zytometrischen Messergebnisse innerhalb von mindestens fünf Normalpersonen (inkl. Rh- Spender) im EMA- Fluoreszenzhistogramm geringer als der Abstand eines Peaks eines Sphärozytose-Patienten?			
5.5.14.4	Werden die Ergebnisse der Morphologie (Mikrosphärozyten), der Retikulozytenzahl, der osmotischen Resistenz und des 5-EMA-Tests miteinander verglichen (Plausibilitätsprüfung)?			
5.5.14.5	Werden Untersuchungen auf Enzymaktivität in den Erythrozyten angeboten?			
5.5.14.6	Werden Untersuchungen auf Enzymaktivität in den Erythrozyten bzw. Hämolysat ausreichend validiert? Wurden dafür Referenz-bereiche ermittelt?			
5.5.14.7	Werden für diese Untersuchungen auf Enzymaktivität in den Erythrozyten bzw. Hämolysat Ringversuche oder Laborvergleiche durchgeführt und werden diese bewertet?			

5.5.15 Immunphänotypisierung⁷⁶

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.15.1	Führt das Labor eine Immunphänotypisierung durch?			
5.5.15.2	Wenn ja, in welchen von den nachfolgend genannten Körper-flüssigkeiten werden vom Labor Immunphänotypisierungen der kernhaltigen Zellen (Leukozyten, Leukämiezellen, etc.) vor-genommen? <ul style="list-style-type: none"> - peripheres Blut (pB) - Knochenmark (KM) - Punktate - Liquor (CSF) - Lymphknoten - Lavage Wurde die Methode dem jeweiligen Material angepasst und dafür validiert?			
5.5.15.3	Wird eine Immunphänotypisierung mit Durchflußzytometrie und/oder mit einer Objektträgermethode durchgeführt (Immunzytochemie oder -fluoreszenz)?			
5.5.15.4	Ist neben der Durchflußzytometrie ein Fluoreszenzmikroskop verfügbar, um fragliche Reaktionen bzw. unplausible Ergebnisse kontrollieren zu können (z.B. unspezifische Bindung, zytoplasmatische IgM-Expression, Plättchenadhärenz an Blasten, Anfärbung durch fluoreszente Zytostatika...)?			
5.5.15.5	Werden die immunologischen Methoden parallel zur Morphologie bzw. Molekulargenetik durchgeführt und befundet?			
5.5.15.6	Wird eine ausreichende Zahl an Proben (Blut und Knochenmark bzw. Körperflüssigkeiten) pro Woche vom Labor bzw. Befunder gesehen, um die Varianz des Immunphänotyps einer Erkrankung beurteilen zu können? ⁷⁷			
5.5.15.7	Falls mehrere Durchflußzytometer vorhanden sind: Werden diese Zytometer durch Mehrfachanalysen von Vollblut-proben unter-einander verglichen? Werden diese Vergleiche bewertet und sind Bewertungsgrenzen definiert?			
5.5.15.8	Wird die Indikation für die Untersuchung und das für den jeweiligen Patienten bzw. Fragestellung geeignete Antikörperpanel durch einen mit der Untersuchung und Interpretation der Ergebnisse vertrauten Arzt/Fachwissenschaftler festgelegt?			

⁷⁶ Die allgemeinen Grundlagen der durchflußzytometrischen Immunphänotypisierung werden in der Checkliste Immunologie behandelt. An dieser Stelle wird auf die spezifischen Aspekte der Immunphänotypisierung von Leukämien und Lymphomen eingegangen.

⁷⁷ Typische Beispiele schwieriger Abgrenzungen sind z.B. die CLL mit der Abgrenzung einer atypischen CLL gegenüber anderen B-NHL wie dem Mantelzell-Lymphom, die Unterscheidung einer Haarzell-Leukämie von Ihrer Variante oder dem splenischen Marginalzonen-Lymphom (SLVL) oder die Beurteilung akuter Leukämien mit gemischtem Phänotyp (mixed phenotyp acute leukemia (MPAL)).

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.15.9	Sind die eingesetzten Antikörper titriert worden (Sättigungsverhalten)? Wird die eingesetzte Blutmenge bzw. Antikörpermenge auf die Leukozytenzahl hin angepasst (ausreichende Menge an Antikörper)?			
5.5.15.10	Wird vor der Immunphänotypisierung dazu ein Leukozytenwert gemessen und ist das Ergebnis dem Mitarbeiter vor dem Ansetzen des Tests bekannt?			
5.5.15.11	Sind die eingesetzten Antikörperklone explizit in einem HLDA-Workshop geprüft worden hinsichtlich der Reaktivität gegen Leukozytenantigene (Nachweis der Zugehörigkeit zu einem Differenzierungscluster (CD))? Sind die eingesetzten Antikörperklone IVD/CE zugelassen? ⁷⁸			
5.5.15.12	Berücksichtigt die Fluorochromauswahl des eingesetzten Antikörperpanels in geeigneter Weise die zu erwartenden Antigen-dichten? ⁷⁹			
5.5.15.13	Sind die eingesetzten Präparations-, Lyse- und / oder Fixationsmethoden auf ihre Eignung für die Immunphänotypisierung geprüft worden?			
5.5.15.14	Werden selbst hergestellte Reagenzien (z.B. Lyse-reagens, Waschpuffer, Stabilisierungslösungen) verwendet und unterliegen diese einer kontinuierlichen Qualitätskontrolle? ⁸⁰			
5.5.15.15	Wird die relative Antigendichte (Rezeptordichte) pro Zelle beurteilt und auf welche Referenz wird Bezug genommen? ⁸¹			

⁷⁸ Bei einigen Antikörpern innerhalb des gleichen Differenzierungsclusters bestehen Unterschiede in der Reaktivität. Der Austausch von Klonen muss daher sorgfältig validiert werden. Dem Umstand wurde teilweise Rechnung getragen durch die Einführung von Indices (z.B. CD1c, CD65s). Hinzu kommt die Empfindlichkeit von den vom Antikörper erkannten Epitopen gegenüber Lyse- und Fixierungsmethoden, so dass auch beim Wechsel der Präparationsmethode eine Validierung vorgenommen werden sollte. Beispiele sind die Epitope bei CD34-Bestimmung (Klasse I – III), Unterschiede finden sich z.B. bei Klonen für CD56 (NCAM), CD59 (MEM43), CD138 für Plasmazellen (Klon BB4 überlegen) oder die Antigenmuster bei MDS. Eine Teilnahme an den spezifischen Ringversuchen und ein Vergleich mit Referenzlaboratorien sind daher sinnvoll.

⁷⁹ Antigene mit niedriger Expressionsdichte (z.B. CD19) benötigen ein stark leuchtendes Fluorochrom (z.B. PE, PE-Cy7, APC) und umgekehrt bei hoher Expressionsdichte (z.B. CD15) ein schwaches Fluorochrom).

⁸⁰ Im Rahmen der Validierung sollte z.B. das maschinelle Differenzialblutbild, mit dem immunologischen systematisch verglichen werden, um den Einfluss des Lyse-reagens und der Waschschriffe zu dokumentieren (z.B. selektiver Verlust der CLL-Zellen bei Waschschriffen). Das manuelle Differenzialblutbild kann bei Diskrepanzen hinzugezogen werden, muss aber aus statistischen Gründen (100 Zellen) und nicht repräsentativer Verteilung der Zellen in unterschiedlichen Bereichen des Ausstrichs relativiert werden.

⁸¹ Bei gesunden Zellen (Personen) ist die Expressionsdichte bei vielen Antigenen biologisch genau geregelt (Anzahl von Rezeptoren/Zelle). Bei malignen Zellen sind die Antigen-Expressionsdichten jedoch oft verändert (vermindert), manchmal auch erhöht (z.B. Haarzellen-Leukämie, z.T. TdT, CD10 oder CD34 bei akuten Leukämien). Daher muss die Antikörpersättigung vollständig (ausreichend) sein (Überprüfung durch Titration, Anpassung der Zellzahl bei hohen Zellkonzentrationen), um solche Vergleiche vornehmen zu können. Veränderte Antigendichten sind ein wichtiger Hinweis für maligne Zellen, können aber auch bei apoptotischen Zellen vorkommen. Verbleibende normale Zellen in der Probe sind oft eine geeignete Referenz.

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.15.16	Wird ein Streulichtgating (FSC vs. SSC) oder ein CD45-Gating für abnorme Zellen bzw. Blasten durchgeführt? Gibt es hierfür eine schriftlich und bildlich festgelegte Vorgehensweise, so dass dies einheitlich gehandhabt wird? ⁸²			
5.5.15.17	Sind die Besonderheiten der Färbung von kritischen Parametern wie Kappa/Lambda, TdT, Cyclin D1 oder ZAP-70 bekannt und werden hierfür jeweils eine eigene Kontrolle durchgeführt? ⁸³			
5.5.15.18	Wird ein schriftlicher Befund erstellt in dem das Markerprofil der Probe zusammengefasst wird (Leukämie-assoziiertes Immunphänotyp, LAIP) und ggf. Differenzialdiagnosen benannt werden?			
5.5.15.19	Sind internationale Klassifikationssysteme wie die WHO-Klassifikation für Tumore des hämatologischen Systems bekannt und werden sie angewendet?			
5.5.15.20	Wird eine Klassifikation und Nomenklatur von Leukämien und Lymphomen nach der aktuellen WHO-Klassifikation vorgenommen? Ist diese als Referenz im Labor vorhanden?			
5.5.15.21	Wird bei der Interpretation der Daten die Verdünnung des Knochenmarks durch Knochenmarksblut bei der Aspiration berücksichtigt? ⁸⁴			
5.5.15.22	Wird dieser Befund von einem auf diesem Gebiet erfahrenen Arzt erstellt oder unter dessen Supervision und hat dieser zuvor die zytometrischen Grafiken gesehen? ⁸⁵			

⁸² Beim sog. Gating von Zellen in den genannten Konfigurationen besteht die Gefahr, dass die pathologischen Zellen nicht im Gate enthalten sind, z.B. kleine Blasten bei T-ALL oder common ALL, CD45-negative Plasmazellen beim Multiplen Myelom oder Haarzellen mit Überexpression von Antigenen und abnormem Streulichtverhalten.

⁸³ Die genannten Analysen erfordern eine besondere Vorgehensweise im Vergleich zur Immunphänotypisierung der Oberflächenantigene zur Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen im Rahmen der Immundefektdiagnostik. Zur Analyse der Leichtketten(LK)-Restriktion (kappa/lambda) müssen die Serumimmunglobuline vor der Markierung durch mehrfaches Waschen entfernt und die dabei freigelegten Fc-Rezeptoren abgesättigt werden zur Vermeidung unspezifischer Bindungen. Die LK werden bei der CLL nur schwach exprimiert, was einen sensitiven Nachweis verlangt (Waschen, polyklonale Antisera, Titration). Eine regelhafte Überprüfung an normalen B-Zellen eines gesunden Spenders als Positivkontrolle ist sinnvoll. Bei TdT (terminale desoxy-Nukleotidyl-Transferase) und Cyclin D1 handelt es sich um zytoplasmatische Antigene, welche eine Permeabilisierung der Zelloberflächenmembran und ebenfalls einen sensitiven Nachweis verlangen. Diese Zellen sind auch im gesunden KM in geringer Zahl als B-Vorläufer vorhanden (Positivkontrolle). ZAP70 ist ein Kernantigen, welches ebenfalls eine besondere und nochmals getrennte Probenvorbereitung verlangt. Es ist in normalen T- und NK-Zellen vorhanden (Positivkontrolle) und bei der Mehrzahl der CLL-Fälle nicht.

⁸⁴ Bei der Knochenmarkaspiration werden oft mehrere Aspirationen vorgenommen. Die Knochenmarkreinheit nimmt mit jeder zusätzlichen Aspiration ab. Zur Bestimmung der KM-Reinheit sind mehrere Verfahren bekannt (Anteil reifen Neutrophilen (CD16++ Zellen), Anteil an Progenitorzellen oder die Holdriet-Formel).

⁸⁵ Aufgrund der verschiedenen Unterformen von Leukämien und Lymphomen mit einer gewissen Spielbreite mit Überlappung des Immunphänotyps und der Integration von Kontextinformationen (Morphologie etc.) ist eine mehrjährige Erfahrung auf dem Gebiet notwendig zur Vermeidung von Fehldiagnosen. In den numerischen Ergebnissen ist nur noch ein Teil der Informationen vorhanden, weshalb die Grafiken vom Befunder gesehen werden müssen (Blastenanteil? Korrektes Gate? Normales Expressionsmuster/Antigendichte? An- oder Abwesenheit normaler Differenzierungswege).

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.15.23	Nimmt das Labor regelmäßig und erfolgreich an Ringversuchen teil, die speziell die Immunphänotypisierung von Leukämien und Lymphomen prüfen? ⁸⁶			
5.5.15.24	Nimmt das Labor regelmäßig an Weiterbildungen teil, die speziell die Immunphänotypisierung von Leukämien und Lymphomen betreffen?			
5.5.15.25	Führt das Labor eine immunzytometrische Diagnostik auf Vorliegen einer Resterkrankung durch (MRD-Diagnostik)?			
5.5.15.26	Sind dem Labor die Besonderheiten des Nachweises von seltenen Zellen bekannt? Hat das Labor seine eigene Nachweisgrenze für den Anteil aberanter Zellen bestimmt?			
5.5.15.27	Werden besondere Antikörperkombinationen angewendet und ein immunologisches Gating eingesetzt?			
5.5.15.28	Nimmt das Labor regelmäßig und erfolgreich an Ringversuchen teil, die speziell die MRD-Diagnostik betreffen?			
5.5.15.29	Führt das Labor eine Bestimmung von Stamm- und Progenitorzellen (CD34) durch aus... - peripherem Blut - Knochenmark - Stammzellapherisaten			
5.5.15.30	Sind dem Labor die Besonderheiten des Nachweises von seltenen Zellen bekannt? Hat das Labor seine eigene Nachweisgrenze für den Anteil CD34-positiver Zellen bestimmt? ⁸⁷			
5.5.15.31	Wird das ISHAGE-Protokoll angewendet u. ein immunologisches Gating eingesetzt (s. Empfehlungen zur CD34-Diagnostik)?			
5.5.15.32	Wird eine single-Plattform oder eine Dual-Plattform-Methode zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt (s. Empfehlungen zur CD34-Diagnostik)? ⁸⁸			

⁸⁶ In der initialen Phase sind Laborvergleiche mit erfahrenen Labors (z.B. Referenzlaboratorien) zusätzlich zum Ringversuch sinnvoll.

⁸⁷ Progenitorzellen (CD34+) weisen im peripheren Blut eine geringe Konzentration auf, weshalb wenige falsch positive Signale (z.B. fluoreszente Proteinaggregate aus dem Konjugatfläschchen), die Ergebnisse beeinflussen können. Umgekehrt kann die Subtraktion falsch positiver Zellen aus der Isotyp-Kontrolle vom CD34-Wert, zu falsch niedrigen CD34-Ergebnissen führen.

⁸⁸ Bei der sog. Single-Plattform-Methode stammen die Ergebnisse von einem Gerät. Bei der Dual-Plattform-Methode werden die prozentualen Ergebnisse aus der Immunzytometrie (%CD34 von Leukozyten) mit der Leukozytenzahl des Hämatologiegeräts multipliziert. Bei der ersten Methode der Konzentrationsermittlung durch Vergleich mit Mikropartikeln (beads) bekannter Konzentration- ist wie auch bei der Dual-Plattform-Methode die Lymphozytenzahl mit der eines kontrollierten Hämatologiegerätes zu vergleichen (Gefahr der Entmischung der Beads im Aufbewahrungsgefäß und später in der Probe).

	Checkliste Klinische Chemie u. Hämatologie - Kapitel Hämatologie -		Revision:	1.0
			Datum:	21.03.2022
			Seite:	31

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.15.33	Nimmt das Labor regelmäßig und erfolgreich an Ringversuchen teil, die speziell die Bestimmung von Progenitorzellen prüfen?			
5.5.15.34	Führt das Labor eine immunzytometrische Diagnostik auf Vorliegen eines GPI-Defektes durch (PNH-Diagnostik)?			
5.5.15.35	Sind dem Labor die Besonderheiten des Nachweises von negativen Zellen bekannt? Hat das Labor seine eigene Nachweisgrenze für den Anteil GPI-negativer Zellen bestimmt? ⁸⁹			
5.5.15.36	Wird die 2x2 Regel angewendet und ein immunologisches Gating eingesetzt (s. Empfehlungen zur PNH-Diagnostik)? ⁹⁰			
5.5.15.37	Nimmt das Labor regelmäßig und erfolgreich an Ringversuchen teil, die speziell die PNH-Diagnostik betreffen?			

5.5.16 Molekulardiagnostische Methoden ⁹¹

		U*	O*	Bemerkungen
5.5.16.1	Werden molekulardiagnostische Methoden (FISH, PCR, Sequenzierung) im Labor zur Leukämie- und Lymphomdiagnostik eingesetzt?			
5.5.16.2	Im Falle, dass die o.g. Analysen nicht im Labor selbst erbracht aber die Ergebnisse im Befund integriert werden: Werden im Befund eindeutige Hinweise auf die Fremddiagnostik gegeben? Sind gutachterliche Aussagen oder Hinweise auf Diagnosen auf den befundenden Arzt/Fachwissenschaftler rückführbar?			

⁸⁹ Die Bestimmung negativer Ereignisse (Zellen) stellt an die durchflusszytometrische Immunphänotypisierung besondere Anforderungen (Reinheit von Lösungen, Auswertestrategie), s. nachfolgende Fußnote

⁹⁰ Für die PNH-Diagnostik existieren amerikanische und deutschsprachige Richtlinien. Letztere sehen eine Untersuchung von mindestens zwei GPI-verankerten Proteinen auf mindestens zwei Zellreihen vor. Das immunologische Gating soll Zelldebris ausgrenzen und eine höhere Sensitivität für GPI-negative Zellen gewährleisten (s. Schrezenmeier H et al., Empfehlungen zur Diagnostik der Paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie: deutsch – österreichischer Konsensus, J Lab Med 2011;35(6):315–327, Sutherland RD et al., Practical Guidelines for the High-Sensitivity Detection and Monitoring of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones by Flow Cytometry, Cytometry Part B 2012; 82B: 195-208.)

⁹¹ Die allgemeinen Grundlagen der Zytogenetik und Molekulargenetik werden in den Checklisten Humangenetik für Zytogenetik und Molekulargenetik behandelt.

5.6 Sicherung der Qualität der Untersuchungsverfahren⁹²

5.6.1 Automatisierte Verfahren

5.6.1.1 Kontrollverfahren

		U*	O*	Bemerkungen
5.6.1.1.1	Gibt es ein schriftlich festgelegtes Verfahren für die periodische Überprüfung des Zählgerätes? ⁹³			
5.6.1.1.2	Wenn vorkalibrierte Geräte benutzt werden: Werden die Kalibrierungen des Herstellers mit adäquaten und für das System geeigneten Kontrollmaterialien verifiziert? ⁹⁴			
5.6.1.1.3	Sind mehrere Hämatologiegeräte innerhalb des Labors vorhanden und werden diese untereinander verglichen? ⁹⁵			
5.6.1.1.4	Sind mehrere Hämatologiegeräte innerhalb der Einrichtung (Klinik) vorhanden und werden diese untereinander verglichen?			
5.6.1.1.5	Gibt es eine schriftlich festgelegte und auch in Benutzung befindliche Verfahrensweise, die die Übereinstimmung bei mehreren gleichartigen Analysensystemen mit automatisierten Verfahren sicherstellt? ⁹⁶ Sind Bewertungsgrenzen hierfür festgelegt?			

⁹² Einige unterschiedliche Methoden können für die Kalibrierung und longitudinale Prozesskontrollen bei Blutzellzählgeräten angewandt werden. Die Kalibrierung kann durchgeführt durch:

- A) Einsatz von mehrfach analysierten Vollblutproben,
- B) Einsatz von industriell hergestellten, zertifizierten und stabilisierten Erythrozytenpräparaten, Leukozytenpräparationen (einschließlich von Ersatzmaterialien für die weißen Zellen) und Plättchen (oder Ersatzmaterialien).

Alle Kalibrationstechniken sollten die regelmäßige Überprüfung der analysierten Hämoglobinkonzentrationen mit Hilfe einer zertifizierten Hämoglobinpräparation einschließen (Standard ist das internationale ICSH/WHO Referenzcyanhämoglobin). Es kann auch Material eingesetzt werden, das von seinem Hersteller durch vergleichende Untersuchung als dem internationalen Referenzcyanhämoglobin äquivalent bescheinigt ist.

⁹³ Wenn stabilisierte Vollblutproben oder andere kommerziell erhältliche Präparationen für die periodische Kalibrierung von Zellzählgeräten eingesetzt werden, müssen die Referenzwerte für die bestimmten Parameter durch primäre Referenzmethoden bestimmt worden sein. Die Bestimmung kann durch das Labor erfolgen oder der Hersteller kann bescheinigen, dass die Bestimmung der Werte durch diese Methoden erfolgt ist. Eine detaillierte Vorschrift für die Kalibrierung muss vorhanden sein und durch das Labor befolgt werden. Von zentraler Bedeutung ist eine klare Festlegung, wann eine Kalibrierung zu erfolgen hat. Sie muss auf der Grundlage der longitudinalen Überprüfung des Messverfahrens beruhen.

⁹⁴ Die Frage sollte mit „E“ beantwortet werden, wenn Geräte benutzt werden, die nur durch das Labor kalibriert werden können. Da vorkalibrierte Geräte nicht durch das Labor einstellbar sein können, sollte die Kalibrierung mit angemessenen Kontrollmaterialien verifiziert werden.

⁹⁵ Die Frage sollte mit „E“ beantwortet werden, wenn Geräte benutzt werden, die nur durch das Labor kalibriert werden können. Da vorkalibrierte Geräte nicht durch das Labor einstellbar sein können, sollte die Kalibrierung mit angemessenen Kontrollmaterialien verifiziert werden.

⁹⁵ Geräte unterschiedlicher Hersteller aber auch gleicher Hersteller können systematische Abweichungen aufweisen, die insbesondere beim Hb-Wert Unterschiede aufweisen können, die zu falschen klinischen Entscheidungen führen können, wenn das Blut des gleichen Patienten abwechselnd an verschiedenen Geräten untersucht wird. Es ist daher zweckmäßig Blutproben eines Patienten nacheinander an solchen Geräten zu untersuchen und statistische Auswertungen zu erstellen.

⁹⁶ Dies betrifft Geräte gleicher Bauart oder verschiedener Messtechnik eines oder mehrerer Hersteller. Durch frische EDTA-Vollblutproben sollen wöchentlich Vergleiche mit normalen und pathologischen Werten vorgenommen werden. Das Parameterspektrum soll dem entsprechen, was in der Klinik berichtet wird und auf den Geräten gleichartig vorhanden ist. Von besonderer Bedeutung sind Parameter mit unmittelbarer klinischer Relevanz (niedrige Leukozyten- bzw. Neutrophilenzahlen, Thrombozytenzahlen, Hb-Werte, MCV).

		U*	O*	Bemerkungen
5.6.1.1.6	Werden im Falle mehrerer Zählgeräte diese durch Mehrfachanalysen von Vollblutproben verglichen? ⁹⁷			

5.6.1.2 Kalibrationsverfahren

		U*	O*	Bemerkungen
5.6.1.2.1	Werden vom Labor Kalibrationen des Hämatologiegerätes vorgenommen?			
5.6.1.2.2	Werden vom Labor Kalibrationen des Hämatologiegerätes vorgenommen? Gibt es eine schriftliche Richtlinie für die periodische Kalibrierung des Zählgerätes mit frischen Vollblutproben? ⁹⁸			
5.6.1.2.3	Beinhaltet die initiale oder primäre Kalibrierung eines Zählgerätes die Doppelbestimmungen von mindestens zehn frischen Vollblutproben, die mit Referenzmethoden einschließlich einer Verifikation anhand eines am ICSH/WHO Standard zertifizierten Hämoglobins untersucht worden sind?			
5.6.1.2.3	Enthält die Richtlinie des Labors für die Kalibrierung von Blutzellzählgeräten bei auftretenden Problemen eine der folgenden Vorgehensweisen: <ul style="list-style-type: none"> - Doppelbestimmungen von mindestens zehn frischen Vollblutproben mit Referenzmethoden, oder - Vergleich mit frischen Vollblutproben, deren Werte mit Doppelbestimmungen durch ein anderes Zählgerät bestimmt wurden, und von dem bekannt ist, dass es richtig kalibriert ist, oder - Überprüfung anhand von stabilisierten Vollblutproben, die kommerziell für die Kalibrierung vertrieben werden. 			
5.6.1.2.4	Werden Zählgeräte mit einer kommerziell vertriebenen, stabilisierten Vollblutpräparation kalibriert? ⁹⁹			
5.6.1.2.5	Wird die Kalibrierung für die Hämoglobinwerte mit Kontrollmaterial durchgeführt, für das der Hersteller die Ableitung vom internationalen Hämoglobinstandard der ICSH/WHO bescheinigt?			

⁹⁷ Wenn „JA“, bitte die nächsten drei Fragen beantworten, wenn „NEIN“, bitte die nächsten drei Fragen mit „E“ markieren.

⁹⁸ Wenn Mehrfachanalysen von Vollblutproben zur Kalibrierung der Zählgeräte verwendet werden (z.B. weil kein geeignetes kommerzielles Kontrollmaterial verfügbar ist), muss eine detaillierte Kalibrierprozedur durch das Labor festgelegt und befolgt werden. Von entscheidender Bedeutung ist es, dass die Notwendigkeit der Kalibrierung auf der Grundlage der Daten der Präzision von Tag zu Tag deutlich wird.

⁹⁹ Wenn „JA“, bitte die nächsten drei Fragen beantworten, wenn nicht, bitte die nächsten drei Fragen mit „E“ markieren.

		U*	O*	Bemerkungen
5.6.1.2.6	Wird die Kalibrierung mit Materialien durchgeführt, die dem Messbereich des automatisierten Verfahrens angemessen sind, und wird sie dokumentiert? ¹⁰⁰			

5.6.2 Longitudinale Überprüfung der Messungen mit automatisierten Blutzellzählgeräten

Longitudinale Kontrollen der Prozess-Qualität für Einzelgeräte oder Vergleiche von Geräten können enthalten:

- A) Einsatz von stabilisierten oder konservierten Vollblutproben,
- B) Aufgehobene Patientenblutproben,
- C) Überwachung von Verschiebungen der Durchschnittswerte für die Indizes der Erythrozyten, oder
- D) Kombinationen aus den obigen Möglichkeiten.

		U*	O*	Bemerkungen
5.6.2.1	Benutzt das Labor konservierte oder stabilisierte Vollblutpräparationen für die longitudinale Prozesskontrolle?			
5.6.2.2	Benutzt das Labor aufgehobene, bereits vorher untersuchte Vollblutproben von Patienten für die longitudinale Prozesskontrolle?			
5.6.2.3	Wird eine angemessene Anzahl an Analysen an stabilisierten Kontrollmaterialien oder an zuvor bestimmten Patientenblutproben durchgeführt und in jeder Schicht mit Gebrauch des Gerätes dokumentiert? ¹⁰¹			
5.6.2.4	Ist sichergestellt, dass bei Verwendung von vorgemessenen Kontrollen für Blutzellzählgeräte die Kontrollwerte der Methodik angemessen sind, und dass die Zielwerte durch das Labor verifiziert worden sind?			
5.6.2.6	Beobachtet das Labor die Bewegung der Durchschnittswerte der Erythrozytenindizes in den Blutproben zur longitudinalen Prozesskontrolle? ¹⁰²			

¹⁰⁰ Die Zielwerte des Kontrollmaterials sollten in den klinischen Entscheidungsbereichen liegen.

¹⁰¹ Wenn stabilisierte Kontrollmaterialien benutzt werden, müssen sie unterschiedliche Messbereiche umfassen (z. B. Normalbereich und erhöhte Werte). Entsprechend sollten aufgehobene Patientenblutproben unterschiedliche Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen enthalten, soweit anwendbar. Die maximal tolerablen Zeiten für die Rückstellung dieser Kontrollproben müssen in den Standardarbeitsanweisungen definiert sein.

¹⁰² Eine Kontrolle der Veränderungen der gewichteten Durchschnittswerte in wiederholten seriellen Untersuchungen von Blutproben ist ausreichend sensitiv, um Abweichungen in der Kalibrierung des Zählgerätes zu erkennen, wenn eine ergänzende Qualitätskontrolle (stabilisierte Referenzmaterialien oder aufgehobene Patientenblutprobe) angewendet wird, um einen Fehler auszuschließen und um die Maskierung einer Abweichung durch eine Verschiebung der Subpopulationen innerhalb der Probenserie zu verhindern. Wenn „JA“, bitte die nächsten vier Fragen beantworten, wenn nicht, die nächsten vier Fragen mit „E“ markieren.

		U*	O*	Bemerkungen
5.6.2.7	Sind die Toleranzgrenzen für die Verschiebung der Parameter der Erythrozyten ausreichend sensibel? ¹⁰³			
5.6.2.8	Wird das Blutzellzählgerät innerhalb einer Analysenserie mit mindestens zwei verschiedenen Kontrollmaterialien überwacht? ¹⁰⁴			

5.6.3 Ringversuche

		U*	O*	Bemerkungen
5.6.3.1	Nimmt das Labor für alle hämatologischen Parameter, die in der RiLiBÄK benannt werden, regelmäßig und erfolgreich an Ringversuchen teil?			
5.6.3.2	Nimmt das Labor für alle von ihm darüber hinaus angebotenen Parameter inklusive der Zytologie regelmäßig und erfolgreich an Ringversuchen teil? ¹⁰⁵			
5.6.3.4	Werden die nicht bestandenen RV auf die Ursache hin untersucht, Korrekturmaßnahmen ergriffen und dies in einem Kommentar festgehalten?			
5.6.3.5	Werden für Untersuchungsverfahren, für die keine Ring-versuche verfügbar sind, Vergleiche mit einem externen Labor durchgeführt und werden diese bewertet?			

5.8. Befunde

Zu allgemeinen Aspekten der Befunderstellung wird ausführlich in den eingangs genannten Checklisten eingegangen. Die Befundung sollte grundsätzlich durch einen Arzt erfolgen, der auf den o.g. Gebieten erfahren ist.

¹⁰³ Die Toleranzgrenzen für die Verschiebung der Erythrozytenindizes müssen so sensitiv sein, dass signifikante Veränderungen der Kalibrierung in jedem Fall aufgedeckt werden. Eine erneute Kalibrierung ist bei geringen Variationen ohne klinische Konsequenz nicht notwendig.

¹⁰⁴ Das Labor muss eine angemessene Anzahl an Kontrolluntersuchungen mit stabilisierten Referenzmaterialien für die Leukozyten- und Thrombozytenzahlen oder mit zuvor untersuchten Patientenblutproben in jeder Schicht durchführen, in der die Blutzellzählgeräte eingesetzt werden. Unter normalen Umständen wird dies bedeuten, dass mindestens zwei Kontrollen in jeder Schicht durchgeführt werden müssen, in der Blutproben untersucht werden. Eine Abweichung von dieser Anzahl ist in begründeten Fällen möglich. Es gibt keine Forderung nach 3 Kontrollwerten. Es sollten kommerziell erhältliche Kontrollproben (Sets) für verschiedene Messbereiche (z. B. normal, niedrig und erhöht) verfügbar sein. Verdünnungen, Kontrollen niedriger Werte (z. B. „Thrombozytopenie“ und/oder „Leukopenie“ als Kontrolluntersuchungen für die Onkologie) sind weniger informative Indikatoren für den Kalibrierungszustand des Gerätes.

¹⁰⁵ Hinweis für den Begutachter: Lassen Sie sich mindestens von einem Quartal die Ringversuchszertifikate zeigen. Es werden über die Parameter der Anlage 1 der RiLiBäk hinaus Ringversuche angeboten (z.B. maschinelles und mikroskopisches Differenzialblutbild, Retikulozyten, Knochenmarkszytologie, Liquorzytologie).

	Checkliste Klinische Chemie u. Hämatologie - Kapitel Hämatologie -		Revision:	1.0
			Datum:	21.03.2022
			Seite:	36

Anmerkungen / Notizen / Ergänzungen

Die vorliegende Checkliste ist Bestandteil weiterer und übergeordneter Checklisten für die Akkreditierung von Laboratorien nach DIN ISO 15189. Der Arbeitskreis Labor der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) hat das vorliegende Kapitel 7.4 in wesentlichen Teilen inhaltlich erstellt. Er setzt sich aus Fachärzten für Innere Medizin, Hämatologie und Laboratoriumsmedizin zusammen und hat ausführlich über diese Checkliste beraten, die nun in ihrer 3. Auflage existiert. Er tagt zweimal im Jahr und befasst sich mit allen Fragen der hämatologischen Labordiagnostik. Ein Teil seiner Mitglieder ist als Gutachter bei Akkreditierungen tätig oder Mitglied in der GLP-Kommission, die das Sektorkomitee des Akkreditierungsausschusses in fachlichen Fragen berät oder im Arbeitskreis medizinische Laboratorien (AML). Er freut sich über Rückmeldungen und Kommentare zur vorliegenden Checkliste seitens der Gutachter und Anwender im Labor, die in künftigen Auflagen berücksichtigt werden können. Bitte wenden Sie sich mit Ihren Anliegen bezüglich dieses Kapitels an den Vorsitzenden des Arbeitskreises Labor oder seinen Stellvertreter. Die Personen und Kontaktdaten sind über die Webseite der DGHO ersichtlich (<http://www.dgho.de>). Alternativ richten Sie Ihre Anfragen an die DAkKS oder den Vorsitzenden der GLP-Kommission (<http://www.dakks.de/>).