

DIN EN ISO 20166-2



ICS 11.100.10

Einsprüche bis 2016-09-01

Entwurf

**Molekularanalytische in-vitro-diagnostische Verfahren –
Spezifikationen für präanalytische Prozesse für formalinfixierte und
paraffineingebettete (FFPE)-Gewebebeurteilungen –
Teil 2: Isolierte Proteine (ISO/DIS 20166-2:2016);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 20166-2:2016**

Molecular in vitro diagnostic examinations –
Specifications for pre-examination processes for formalin-fixed and
paraffin-embedded (FFPE) tissue –
Part 2: Isolated proteins (ISO/DIS 20166-2:2016);
German and English version prEN ISO 20166-2:2016

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-07-01 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfes
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de bzw. für Norm-Entwürfe
der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort
wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an named@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann
im Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter
www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed), 10772 Berlin (Hausanschrift:
Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 51 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 20166-2:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 212 „Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 140 „In-vitro-Diagnostik“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) erstellt.

Für diesen Norm-Entwurf ist der Arbeitsausschuss NA 063-03-03 AA „Qualitätsmanagement in medizinischen Laboratorien“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed), zuständig.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN ISO 20166-2 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 9000	siehe	DIN EN ISO 9000
ISO 15189	siehe	DIN EN ISO 15189
ISO 17020	siehe	DIN EN ISO/IEC 17020
ISO 17511	siehe	DIN EN ISO 17511

Nationaler Anhang NA **(informativ)**

Literaturhinweise

DIN EN ISO 9000:2005-12, *Qualitätsmanagementsysteme — Grundlagen und Begriffe (ISO 9000:2005); Dreisprachige Fassung EN ISO 9000:2005*

DIN EN ISO 15189:2013-03, *Medizinische Laboratorien — Anforderungen an die Qualität und Kompetenz (ISO 15189:2012); Deutsche Fassung EN ISO 15189:2012*

DIN EN ISO/IEC 17020:2012-07, *Konformitätsbewertung — Anforderungen an den Betrieb verschiedener Typen von Stellen, die Inspektionen durchführen (ISO/IEC 17020:2012); Deutsche und Englische Fassung EN ISO/IEC 17020:2012*

DIN EN ISO 17511:2003-11, *In-vitro-Diagnostika — Messung von Größen in Proben biologischen Ursprungs — Metrologische Rückführbarkeit von Werten, die Kalibriermaterialien und Kontrollmaterialien zugeordnet sind (ISO 17511:2003); Deutsche Fassung EN ISO 17511:2003*

Molekularanalytische in-vitro-diagnostische Verfahren — Spezifikationen für präanalytische Prozesse für formalinfixierte und paraffineingebettete (FFPE)-Gewebeproben — Teil 2: Isolierte Proteine (ISO/DIS 20166-2:2016)

Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examinations processes for formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue — Part 2: Isolated proteins (ISO/DIS 20166-2:2016)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

STD Version 2.8f

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisung	6
3 Begriffe	6
4 Allgemeine Betrachtung	10
5 Außerhalb des Labors	11
5.1 Entnahme der Primärprobe	11
5.1.1 Angaben zum Spender der Primärprobe/Patienten	11
5.1.2 Angaben zur Primärprobe	12
5.1.3 Aufbereitung der Primärprobe	12
5.2 Transportbezogene Anforderungen	13
6 Im Labor	13
6.1 Angaben zum Erhalt der Primärprobe	13
6.2 Formalinfixierung der Primärprobe oder Probe	13
6.3 Auswertung der Pathologie des Untersuchungsmaterials und Auswahl der Probe	15
6.4 Nachträgliche Fixierung gefrorener Proben	15
6.5 Verarbeitung und Paraffineinbettung	16
6.6 Lagerungsbedingungen	16
6.7 Gesamtproteinisolierung	17
6.7.1 Allgemeines	17
6.7.2 Allgemeine Angaben zur Proteinisolierung	17
6.7.3 Verwendung handelsüblicher Kits	17
6.7.4 Anwendung laboreigener Protokolle	17
6.8 Qualitätsbewertung isolierter Proteine	18
6.9 Lagerung des isolierten Gesamtproteins	19
Anhang A (informativ) Proteinuntersuchungen zeigen Veränderungen der Proteinmengen während kalter Ischämie)	20
A.1 Einleitung	20
A.2 Beispiel	20
A.2.1 Allgemeines	20
A.2.2 Versuchsdurchführung	21
A.2.3 Ergebnisse	23
A.3 Schlussfolgerungen	23
A.4 Weiterführende Literatur	24
Literaturhinweise	25

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 20166-2:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 212 „Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 140 „In-vitro-Diagnostik“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 20166-2:2016 wurde vom CEN als prEN ISO 20166-2:2016 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 212, *Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems*.

ISO 20166 besteht aus folgenden Teilen unter dem allgemeinen Titel *Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examinations processes for formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue*:

- *Part 1: Isolated RNA*
- *Part 2: Isolated proteins*
- *Part 3: Isolated DNA*

Einleitung

Die molekulare *In-vitro*-Diagnostik, darunter auch die molekulare Pathologie, hat bedeutende Fortschritte in der Medizin ermöglicht. Weitere Fortschritte werden von neuen Technologien erwartet, mit denen Nukleinsäuren, Proteine und Metaboliten in humanen Geweben und Körperflüssigkeiten analysiert werden. Die Profile und/oder die Integrität dieser Moleküle können bzw. kann sich jedoch im Verlauf der Entnahme der Primärprobe, des Transports, der Lagerung und der Verarbeitung drastisch verändern und dadurch die Diagnostik bzw. Forschungsergebnisse unzuverlässig oder sogar unmöglich machen, da in der anschließenden Untersuchung nicht die Situation im Patienten, sondern ein künstliches Molekülprofil bestimmt wird, das in einem präanalytischen Verfahren geschaffen wurde.

Obwohl ursprünglich angenommen wurde, dass eine Proteinisolation aus mit Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben (FFPE-Geweben) aufgrund der Vernetzungsaktivitäten von Formaldehyd unmöglich sei, wurden die Isolationsverfahren für Proteine in den letzten Jahren erheblich verbessert. Als wesentlicher Schritt in den Proteinisolationsverfahren wurde eine wärmeinduzierte Umkehr der durch Formaldehyd bewirkten Vernetzungen nachgewiesen [4], [5]. Derzeit nehmen die meisten Prüfer an, dass aus FFPE-Gewebe isolierte Proteine für die nachgeschalteten Proteomik-Untersuchungen geeignet sind^[6].

Proteinprofile, Proteinintegritäten und Protein-Protein-Interaktionen in Geweben können sich vor und nach der Probenahme drastisch verändern (z. B. aufgrund von Geninduktion, Herabregulation von Genen, Proteinabbau). Die Mengen der Proteinspezies können sich je nach Gewebe des Gewebespenders/Patienten unterschiedlich verändern. Die Genexpression kann durch die jeweilige Behandlung oder den Eingriff (Operation, Biopsie) oder die zur Anästhesie oder Behandlung von Begleiterkrankungen verabreichten Medikamente sowie abhängig von unterschiedlichen Umgebungsbedingungen nach der Gewebeentnahme aus dem Körper beeinflusst sein.

Die Fixierung mit Formalin und die Einbettung in Paraffin können außerdem zu Modifikationen der Proteinmoleküle führen, was sich auf die Gültigkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse der Untersuchungen auswirken kann.

Daher ist es wichtig, dass besondere Maßnahmen getroffen werden, um die beschriebenen Profilveränderungen und -modifikationen im Gewebe im Hinblick auf die anschließende Untersuchung möglichst gering zu halten.

Eine Normung des gesamten Prozesses von der Primärprobenahme bis zur Proteinuntersuchung ist notwendig. Zur Bestimmung der wichtigen Einflussfaktoren wurden entsprechende Studien durchgeführt. Bei der Festlegung und Normung einzuhaltende Schritte während der sogenannten präanalytischen Phase für mit Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe (FFPE-Gewebe) im Rahmen der Proteinuntersuchung stützt sich diese Internationale Norm auf diese Arbeiten.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm empfiehlt die Handhabung, Dokumentation, Lagerung und Verarbeitung von aus FFPE-Gewebe bestehendem und für die Untersuchung isolierter Proteine vorgesehenem Untersuchungsmaterial während der präanalytischen Phase vor Beginn der molekularen Analyse. Diese Internationale Norm gilt für molekulare *in-vitro*-diagnostische Untersuchungen, wozu auch im Labor entwickelte Prüfungen zählen, die von medizinischen Laboratorien und Laboratorien der molekularen Pathologie durchgeführt werden. Sie soll auch von Laborkunden, Entwicklern und Herstellern von *In-vitro*-Diagnostika sowie Einrichtungen und kommerziellen Organisationen, die in der biomedizinischen Forschung tätig sind, Biobanken und Aufsichtsbehörden eingesetzt werden.

Dieses Dokument gilt nicht für eine immunhistochemische Proteinuntersuchung.

ANMERKUNG Zu bestimmten Bereichen, die in dieser Internationalen Norm behandelt werden, gelten möglicherweise lokale, nationale oder regionale Bestimmungen oder Anforderungen.

2 Normative Verweisung

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 15189:2012, *Medical laboratories — Requirements for quality and competence*

ISO 15190, *Medical laboratories — Requirements for safety*

ISO 17020:2012, *Conformity assessment – Requirements for the operation of various types of bodies performing inspection*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 15189:2012 und die folgenden Begriffe.

3.1

Umgebungstemperatur

ungeregelte Temperatur der Umgebungsluft

3.2

Analyt

der im Namen der messbaren Größe angegebene Bestandteil (ISO 17511)

3.3

Leistung der analytischen Prüfung

Genauigkeit, Präzision und Sensibilität einer Prüfung bei der Messung eines betreffenden Analyts

3.4

kalte Ischämie

Zustand nach der Gewebeentnahme aus dem Körper bis zur Stabilisierung oder Fixierung

3.5

Diagnose

Feststellung einer Erkrankung anhand ihrer Anzeichen und Symptome, wobei im diagnostischen Verfahren Untersuchungen und Prüfungen zur Einordnung des Zustands einer Person in getrennte und verschiedene Kategorien und Unterkategorien enthalten sein können, auf deren Grundlage medizinische Entscheidung zur Behandlung und Prognose getroffen werden können

3.6

DNase

Desoxyribonuklease katalysiert den Abbau von DNS in kleinere Komponenten

3.7

Untersuchung analytische Phase

Folge von Handlungen, deren Ziel die Bestimmung des Wertes oder der Merkmale einer Eigenschaft ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Prozesse, die mit dem isolierten Analyt beginnen und jegliche Art von Parameterprüfung oder chemischer Bearbeitung für die quantitative oder qualitative Untersuchung umfassen

[QUELLE: ISO 15189:2012, 3.7, modifiziert — Der Begriff und die Definition werden ohne die im Original vorhandenen Anmerkungen verwendet]

3.8

FFPE-Gewebe

mit Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe

3.9

Formalin

gesättigte, wasserhaltige, wässrige Formaldehydlösung mit einem Massenanteil an Formaldehyd von 37 % (entspricht einem Volumenanteil von 40 %), bezeichnet als 100 % Formalin

3.10

Formalinfixierung

Behandlung einer Probe mit standardgepufferter Formalinlösung zur Stabilisierung

3.11

Zuschneiden

makroskopische Untersuchung

Untersuchung pathologischer Proben mit dem bloßen Auge, um diagnostische Informationen zu erhalten, und gleichzeitige Weiterverarbeitung zur anschließenden mikroskopischen Untersuchung

3.12

homogen

einheitlich in Struktur und Zusammensetzung

3.13

Belastungssubstanzen

eine Komponente der Probe, außer dem Analyt, die eine Abweichung in der gemessenen Konzentration verursacht

3.14

Paraffineinbettung

Verfahren, in dem eine Gewebeprobe in Paraffin gelegt wird, um eine harte umgebende Matrix zu erhalten, damit dünne mikroskopische Schnitte abgeschnitten werden können

3.15

präanalytische Verfahren

präanalytische Phase

präanalytischer Arbeitsablauf

Verfahrensschritte, in chronologischer Reihenfolge, die mit der Anforderung des Arztes einschließlich der Untersuchungsanforderung beginnen, die Vorbereitung und Identifizierung des Patienten, das chirurgische Verfahren, die Entnahme der Primärprobe(n), die vorübergehende Lagerung, den Transport zum und im Analyselabor, die Aliquotierung, Gewinnung, Isolierung der Analyte einschließen und mit dem Beginn der analytischen Untersuchung enden

Anmerkung 1 zum Begriff: Die präanalytische Phase beinhaltet vorbereitende Prozesse, z. B. Proteinisolierungsverfahren, die das Ergebnis der beabsichtigten Untersuchung beeinflussen.

[QUELLE: ISO 15189:2012, 3.15, modifiziert — Ein zusätzlicher Begriff wurde hinzugefügt und weitere Einzelheiten wurden aufgenommen]

3.16

Primärprobe

Untersuchungsmaterial

getrennter Teil einer Körperflüssigkeit, Atemluft, Haar oder eines Gewebes, entnommen zur Untersuchung, Erforschung oder Analyse von einer oder mehreren Größen oder Eigenschaften, als Annahme für die Beschaffenheit des Ganzen

[QUELLE: ISO 15189:2012, 3.16, modifiziert — Der Begriff und die Definition werden ohne die im Original vorhandenen Anmerkungen verwendet]

3.17

Eignungsprüfung

bestimmt die Leistungsfähigkeit einzelner Laboratorien für spezifische Prüfungen oder Messungen

3.18

Protein

Art eines biologischen Makromoleküls, das aus einer oder mehreren Ketten mit einer definierten Sequenz von Aminosäuren zusammengesetzt ist, die durch Peptidbindungen verbunden sind

3.19

Proteinprofil

Mengen der einzelnen Proteinmoleküle, die in einer Probe vorhanden sind und die gemessen werden können, wenn keine Verluste, Hemmungen und Störungen auftreten

3.20

Proteinspezies

Mengen eines chemisch klar definierten Proteins, das einem Spot auf einem Hochleistungs-2D-Gelelektrophoresebild entspricht

[QUELLE: Jungblut *et. al.* 1996]^[7]

3.21

PTM

posttranslationale Modifikationen

chemische Veränderungen einer primären Proteinstruktur, die für die Übertragung einer biologischen Aktivität auf einem Protein oft entscheidend sind

[QUELLE: Encyclopedia of Psychopharmacology, 2010]^[8]

3.22

Raumtemperatur

Temperatur, die für die Anwendung dieses Dokuments als 18 °C bis 25 °C definiert ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Lokale oder nationale Bestimmungen können unterschiedliche Definitionen haben.

3.23

Probe

ein Teil oder mehrere Teile, das (die) einer Primärprobe entnommen wird (werden)

[QUELLE: ISO 15189:2012, 3.24, modifiziert — Das Beispiel wurde nicht übernommen]

3.24

Stabilität

Fähigkeit eines Probenmaterials, bei der Lagerung unter festgelegten Bedingungen einen bestimmten Merkmalswert innerhalb festgelegter Grenzwerte für eine festgelegte Zeitdauer aufrechtzuerhalten

Anmerkung 1 zum Begriff: Für die Anwendung dieses Dokuments ist der Analyt das isolierte Protein.

[QUELLE: ISO Guide 30:1992, 2.7]

3.25

standardgepufferte Formalinlösung

neutral gepuffertes Formalin (NBF, en: neutral buffered formalin)

10%ige wässrige Formalinlösung mit einem Massenanteil an Formaldehyd von 3,7 % (entspricht einem Volumenanteil von 4 %), auf pH 6,8 bis pH 7,2 gepuffert

Anmerkung 1 zum Begriff: Standardgepufferte Formalinlösungen enthalten häufig kleine Mengen Methanol zur Unterbindung der Oxidation und Polymerisation des Formaldehyds.

3.26

Lagerung

andauernde Unterbrechung des präanalytischen Arbeitsablaufes einer Probe bzw. eines Analyts oder eines ihrer Derivate, z. B. eingefärbte Schnitte oder Gewebeblöcke, unter den zum Erhalt der Eigenschaften geeigneten Bedingungen

Langfristige Lagerung erfolgt in der Regel in Lagerräumen von Laboratorien oder in Biobanken

3.27

Gewebeverarbeiter

automatisiertes Instrument zur Fixierung, Dehydrierung und Clearing von Gewebe und zur Paraffininfiltration

3.28

Validierung

Bestätigung durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die Anforderungen für einen spezifischen beabsichtigten Gebrauch oder eine spezifische beabsichtigte Anwendung erfüllt worden sind

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Begriff „validiert“ wird zur Bezeichnung des entsprechenden Status verwendet.

Anmerkung 2 zum Begriff: Aus ISO 9000:2005, Definition 3.8.5.

[QUELLE: ISO 15189:2012, 3.26]

3.29

Verifizierung

Bestätigung durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass festgelegte Anforderungen erfüllt worden sind

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Begriff „verifiziert“ wird zur Bezeichnung des entsprechenden Status verwendet.

Anmerkung 2 zum Begriff: Bestätigung kann aus Tätigkeiten bestehen wie z. B.:

- Durchführen alternativer Berechnungen;
- Vergleichen einer neuen Entwicklungsspezifikation mit einer bereits bewährten Entwicklungsspezifikation;
- Durchführung von Prüfungen und Erbringen von Nachweisen und
- Bewertung von Dokumenten bevor sie herausgegeben werden.

[QUELLE: ISO 9000:2005, 3.8.4]

3.30

warme Ischämie

Zustand, bei dem das Gewebe von seiner normalen sauerstoff- und nährstoffhaltigen Blutzufuhr getrennt ist, während es am Körper ist, bis es vom Körper entfernt wird

3.31

Arbeitsablauf

Reihe von Aktivitäten, die zur Beendigung einer Aufgabe erforderlich sind

4 Allgemeine Betrachtung

Zu allgemeinen Aussagen hinsichtlich von Qualitätsmanagementsystemen medizinischer Laboratorien und insbesondere hinsichtlich der Entnahme und Handhabung von Primärproben (einschließlich der Vermeidung von Kreuzkontaminationen) siehe ISO 15189:2012, 4.2, 5.4.4. Die Anforderungen zu Laboratoriumsmaterial, Reagenzien und Verbrauchsgüter müssen in Übereinstimmung mit ISO 15189:2012, 5.3 befolgt werden; ISO 15189:2012, 5.5.1.2 und 5.5.1.3 können ebenfalls anwendbar sein.

Alle Schritte eines diagnostischen Arbeitsablaufes können die endgültige Leistung der analytischen Prüfung beeinflussen. Daher muss der gesamte Arbeitsablauf, einschließlich biomolekulare Stabilität und Lagerbedingungen der Proben, verifiziert und validiert werden. Schritte des Arbeitsablaufes, die nicht immer kontrolliert werden können (z. B. warme Ischämie) sind zu dokumentieren, ihre Auswirkungen auf die Leistung der analytischen Prüfung ist zu untersuchen und Maßnahmen zur Risikoverringerung sind zu ergreifen, um die notwendige Leistung der analytischen Prüfung zu erhalten. In diesen Fällen wird eine Risikobeurteilung empfohlen.

Die Stabilität der betreffenden spezifischen Proteine und ihrer posttranslationalen Modifikationen (sofern für den Test von Bedeutung) sollte vor der Entwicklung und Umsetzung einer analytischen Prüfung während des gesamten präanalytischen Verfahrens untersucht werden.

Bevor Gewebe in standardgepufferter Formalinlösung fixiert werden, können sich die Proteinmengen, die Konformationen und der Bindungszustand verändern, z. B. durch Proteinabbau und veränderte Synthese nach Geninduktion, Herabregulation von Genen, RNS-Degradation und Veränderungen des biochemischen Stoffwechselwegs und des Energiezustands. Diese Effekte hängen von der Dauer der warmen und kalten Ischämie und der Umgebungstemperatur vor der Formalinfixierung ab. Darüber hinaus können diese Veränderungen in den unterschiedlichen Gewebeproben der Spender/Patienten verschieden ausfallen.

Allgemein ist das Risiko von Veränderungen des Proteinprofils umso höher, je länger die warme und kalte Ischämie dauert und je höher die Umgebungstemperatur vor dem Fixieren der Gewebeprobe ist.

ANMERKUNG Eine länger andauernde kalte Ischämie führt zu Änderungen in der Menge von Protein (z. B. Cytokeratin 18) und Phosphoprotein (z. B. Phospho-p42/44). ^{[9], [10]} Die Lagerung des Untersuchungsmaterials auf Eis verringert diesen Effekt. Proteinmengen und Proteinmodifikationen können je nach Herkunft und Art des Gewebes, je nach Grunderkrankung, chirurgischem Verfahren, Medikamentengabe und den zur Anästhesie oder Behandlung von Begleiterkrankungen verabreichten Medikamenten sowie abhängig von unterschiedlichen Umgebungsbedingungen nach der Gewebeentnahme aus dem Körper variieren.

Da die warme Ischämie schwer zu normen ist, sollte ihre Dauer dokumentiert werden. Ist eine kalte Ischämie nicht zu vermeiden, muss ihre Dauer dokumentiert werden; die Umgebungstemperaturen der Transportbehälter des Untersuchungsmaterials sollten dokumentiert werden. Wird das Untersuchungsmaterial zur Formalinfixierung in eine andere Einrichtung transportiert, muss die Transportdauer dokumentiert werden und außerdem sollten die Umgebungsbedingungen dokumentiert werden.

Darüber hinaus bewirkt die Formalinfixierung Modifikationen bei Biomolekülen und führt zu einer suboptimalen Leistung des aus FFPE-Gewebe isolierten Proteins ^[12], was bei der Qualitätslenkung und der Anwendung von molekularen Tests berücksichtigt werden sollte. Eine Testoptimierung für FFPE-Gewebe oder die Anwendung nicht vernetzender Alternativen zu standardgepufferter Formalinlösung sind Möglichkeiten, diese Probleme für molekulare Untersuchungen zu minimieren.

Sicherheitsbestimmungen zu Transport und Handhabung müssen berücksichtigt werden (siehe ISO 15189:2012, 5.2.3 und 5.4.5 und ISO 15190).

Während des gesamten präanalytischen Verfahrens müssen Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden, um Kreuzkontaminationen unter den Proben zu vermeiden, z. B. durch Verwendung von Material für den einmaligen Gebrauch, wo möglich, oder angemessene Reinigungsverfahren zwischen der Aufbereitung der einzelnen Proben.

Wird ein handelsübliches Produkt nicht nach den Herstellerangaben angewendet, liegt die Verantwortung für dessen Verwendung und Leistung beim Anwender.

5 Außerhalb des Labors

5.1 Entnahme der Primärprobe

5.1.1 Angaben zum Spender der Primärprobe/Patienten

Die Dokumentation hat die Identifikationsnummer des Primärprobenspenders/des Patienten zu enthalten, die in Form eines Codes vorliegen kann.

Die Dokumentation sollte unter anderem Folgendes umfassen:

- a) den entsprechenden Gesundheitszustand des Primärprobenspenders/Patienten [z. B. gesund, Erkrankungsart, Begleiterkrankung, demografische Angaben (wie Alter und Geschlecht)];
- b) die Informationen zu routinemäßigen medizinischen Behandlungen und Sonderbehandlungen vor der Gewebeentnahme (z. B. Anästhetika, Medikationen, chirurgische oder diagnostische Verfahren);
- c) die erforderliche Zustimmung des Spenders der Primärprobe/Patienten.

5.1.2 Angaben zur Primärprobe

Die Dokumentation muss unter anderem Folgendes umfassen:

- a) den Beginn der Ischämie im Körper (warme Ischämie) durch Dokumentation des Zeitpunkts der Ligatur/des Abklemmens von für die Ischämie relevanten Gefäßen (üblicherweise der Zeitpunkt des Abklemmens von Arterien);
- b) die Uhrzeit und das Datum der Gewebeentnahme vom Körper und das Entnahmeverfahren (z. B. Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB), Resektion, für die Entnahme verwendetes Biopsiegerät);
- c) die Beschreibung der Gewebeart, des Gewebezustands (z. B. erkrankt, von der Erkrankung nicht betroffen) und des Herkunftsorgangewebes, einschließlich Verweisungen auf jede inner- oder außerhalb des Operationssaals vom Chirurgen, Radiologen oder Pathologen vorgenommene Markierung;
- d) die Dokumentationsschritte nach 6.2, wenn die Formalinfixierung außerhalb des Labors beginnt.

In der Dokumentation sollte zudem die Identifikationsnummer der für die Probeentnahme zuständigen Person angegeben sein.

5.1.3 Aufbereitung der Primärprobe

Folgende Schritte müssen durchgeführt werden:

1. die Dokumentation aller Zusätze zu oder Modifikationen der Primärprobe nach der Entnahme aus dem Körper (z. B. Kennzeichnung der Lage des Untersuchungsmaterials (z. B. Markierung mit Tinte, Nahtstiche), Schnitt(e));
2. die Auswahl und Verwendung von Entnahmebehältern und -verpackungen (z. B. Kühlbox, Kiste zum Lagern und Transportieren, Vakuumverpackung) entsprechend der geltenden Transportbestimmungen;
3. die Auswahl und Anwendung von Stabilisierungsverfahren (z. B. Kühlverfahren) für den Transport;

ANMERKUNG 1 Ein versehentliches Gefrieren und Tauen des Gewebes (z. B. durch falsche Anwendung von Kühlpackungen) kann zu einem Proteinabbau führen, wenn das Gewebe anschließend taut. Außerdem kann dadurch die morphologische Charakterisierung beeinträchtigt werden.

ANMERKUNG 2 Dieser Schritt kann entfallen, wenn das Untersuchungsmaterial direkt in standardgepufferte Formalinlösung überführt wird (siehe 6.2).

4. die Beschriftung des Entnahmebehälters (z. B. Registrierungsnummer, Strichcode, Art und Menge der Primärprobe und Ursprungsorgan des Gewebes) sowie zusätzliche Dokumentation (Angaben entsprechend 5.1.1, 5.1.2 und 5.1.3, 1. bis 3.). Wenn ein einzelner Behälter mehrere Aliquote desselben Untersuchungsmaterials enthält und die Aliquote unterschiedliche Merkmale repräsentieren (z. B. Gewebeart, Erkrankungszustand, Lage), muss dies dokumentiert werden.

Das Untersuchungsmaterial sollte unverzüglich nach der Entnahme aus dem Körper in den Transportbehälter überführt werden. Anschließend sollte der Behälter auf Eis oder bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden, um Veränderungen des Proteinprofils auf ein Mindestmaß zu beschränken.

Die Umgebungstemperaturen des Transportbehälters während der kalten Ischämie (z. B. Temperaturen in unterschiedlichen Räumen, Transport) sollten dokumentiert werden. Wenn die Temperatur nicht gemessen werden kann, sollte der Temperaturbereich durch Einteilung als Umgebungstemperatur, Raumtemperatur oder bei 2 °C bis 8 °C geschätzt werden.

5.2 Transportbezogene Anforderungen

Das mit der klinischen oder chirurgischen Abteilung zusammenarbeitende Labor muss mit dieser ein Protokoll für den Transportvorgang des Untersuchungsmaterials erstellen.

Die Überwachung der Temperatur sollte in angemessener Weise erfolgen.

Sofern sich die Primärprobe nicht bereits in der standardgepufferten Formalinlösung befindet, sollte sie unverzüglich auf Eis oder bei 2 °C bis 8 °C transportiert werden, um Veränderungen des Proteinprofils auf ein Mindestmaß zu beschränken.

ANMERKUNG Es gibt Belege dafür, dass Proteine in Geweben in Kunststoffbeuteln unter Vakuum bei 0 °C bis 4 °C während des Transports stabilisiert werden können^[13], bevor die Proben in Biobanken gelagert oder für histopathologische Beurteilungen verwendet werden.

Wird die Primärprobe bereits außerhalb des Labors in standardgepufferte Formalinlösung überführt, sollte die Temperatur während des Transports die Raumtemperatur nicht überschreiten.

Die Einhaltung des Transportprotokolls muss dokumentiert werden. Alle Abweichungen von diesem Protokoll müssen beschrieben und dokumentiert werden.

6 Im Labor

6.1 Angaben zum Erhalt der Primärprobe

Die Identifikationsnummer oder der Name der Person, die die Primärprobe entgegennimmt, muss dokumentiert werden. Der Zeitpunkt des Probeneingangs und der Zustand (z. B. Beschriftung, Transportbedingungen einschließlich Temperatur, Art und Menge der Primärprobe, Undichtigkeit/Beschädigung des Behälters) des entgegengenommenen Untersuchungsmaterials müssen dokumentiert werden. Alle Abweichungen vom Transportprotokoll (siehe 5.2) müssen dokumentiert werden.

6.2 Formalinfixierung der Primärprobe oder Probe

Dieses Verfahren gilt für die Primärprobe und für die entstandene(n) Probe(n), falls ein oder mehrere Teile aus einer Primärprobe entnommen wurden.

Als Fixiermittel sollte standardgepufferte Formalinlösung verwendet werden.

ANMERKUNG In einigen Ländern wird die standardgepufferte Formalinlösung als neutral gepuffertes Formalin (NBF) bezeichnet.

Der pH-Wert und die Konzentration der standardgepufferten Formalinlösung sollten regelmäßig überprüft werden, denn Formalin ist nicht stabil (z. B. da es zur Oxidation zu Ameisensäure neigt)^[14].

Folgende Schritte müssen durchgeführt werden:

1. die Konsultation des Datenblatts des Herstellers zur Materialsicherheit (MSDS) vor der Handhabung der standardgepufferten Formalinlösung;

ANMERKUNG Formaldehyd ist ein Gefahrstoff, der das Gewebe durchdringt und chemische Veränderungen von Biomolekülen bewirkt.

2. die Dokumentation des Zeitpunkts, zu dem die Primärprobe oder Probe des Gewebes in standardgepufferte Formalinlösung eingebracht wird;

ANMERKUNG Die Gesamtdauer der Formalinfixierung kann anschließende Untersuchungen beeinflussen, z. B. immunhistologische Techniken oder auf Nukleinsäure basierende molekulare Untersuchungen. Die optimale Dauer der Formalinfixierung kann je nach Gewebeart und -größe unterschiedlich sein. Bei größeren Operationspräparaten, z. B. eines ektomierten Magens, kann aufgrund des langsamen Eindringens von Formaldehyd vom Äußeren ins Innere des Gewebes vor dem Zuschneiden eine inhomogene Fixierung stattfinden. Überschreitet die Formalinfixierungsdauer 24 h, kann dies zu einer Vernetzungsintensität führen, die die analytische Untersuchung der Proteine beeinträchtigt. Die Proteinausbeute verringert sich mit zunehmender Fixierungsdauer nachweislich^{[15], [16]}.

BEISPIEL Bei Gewebestücken mit einer Dicke von 5 mm ist eine Fixierdauer zwischen 12 h und 24 h in den meisten Fällen für eine optimale Durchdringung und Fixierung angemessen. Siehe auch 6.7.2.

3. die Auswahl des Entnahmebehälters bzw. der Entnahmebehälter:

- a) das Fassungsvermögen der Entnahmebehälter sollte ein vollständiges Eintauchen der Primärprobe in die standardgepufferte Formalinlösung ermöglichen. Das Mindestverhältnis zwischen standardgepufferte Formalinlösung und Gewebe hängt vom jeweiligen Gewebe ab, sollte aber mindestens 10:1 (Volumen zu Volumen) betragen[14]. Um eine vollständige Formalinfixierung größerer Proben sicherzustellen, sollte eine besondere Handhabung des Gewebes, zum Beispiel Einschnitt(e) in solide Organe oder Eröffnen von Hohlorganen, erfolgen;

Größere Primärproben müssen möglicherweise halbiert und davon ein Anteil ausgewählt werden, damit eine fixierende Durchdringung gewährleistet ist. In diesem Fall ist die standardgepufferten Formalinlösung regelmäßig zu wechseln.

- b) bei Verwendung von Behältern, die bereits mit standardgepufferter Formalinlösung gefüllt sind, müssen die Anleitungen des Produktanbieters eingehalten werden;
 - c) der Behälter muss sicher verschließbar sein;
4. die Beschriftung des Behälters (z. B. durch selbstklebende Etiketten, Beschriftung von Hand, Hochfrequenz-Identifizierungs-Geräte (RFID), vorbeschriftete Behälter, Strichcodes) muss die Rückverfolgbarkeit der Primärproben oder Proben sicherstellen. Aus diesem Grund hat die Beschriftung des Entnahmebehälters mindestens folgende Angaben zu enthalten:
- a) die Identifikationsnummer des Patienten/Spenders, die einmalige Identifikationsnummer der Primärprobe/Probe und das Datum, an dem die Probe entnommen wurde, die alle in Form eines Codes vorliegen können;
 - b) die grundlegenden Informationen z. B. zur Gewebeart, dem Gewebezustand und damit zusammenhängende zusätzliche Informationen, wie betroffen (z. B. Tumor) oder nicht betroffen, es sei denn, ein Probennachverfolgungssystem kann diese Informationen in Verbindung mit der Kennzeichnung der Primärprobe oder Probe unter 6.2, 4. a) liefern;
 - c) die eindeutige Nummerierung jedes Behälters, die in 6.2, 4. a) enthalten sein kann;
5. die Dokumentation der Arten, der Menge sowie Beschreibung der Primärproben oder Proben.

Es sollte berücksichtigt werden, dass bei einigen Erkrankungen, zum Beispiel bei Tumoren, molekulare Merkmale möglicherweise nicht homogen in der Primärprobe oder Gewebeprobe vorliegen. Daher ist es wichtig, dass der Teil der eigentlichen, für die molekulare Analyse verwendeten Primärprobe oder Probe des Gewebes von einem medizinisch qualifizierten (z. B. zertifizierten) Pathologen ausgewertet wird. Dabei sollte dokumentiert werden, welche Eigenschaften einer Erkrankung sich tatsächlich in der für die molekulare Untersuchung verwendeten Primärprobe oder Probe des Gewebes widerspiegeln (z. B. können im Zentrum und in der Invasionsfront des Tumors unterschiedliche molekulare Mechanismen aktiviert sein; außerdem können Tumore aus Bereichen zusammengesetzt sein, die unterschiedliche Differenzierungsgrade aufweisen).