

1. Zweck

Dieses Dokument gibt einen Überblick über das molekularpathologische Leistungsspektrum, das die Abteilung XIII Pathologie des Bundeswehrkrankenhauses Ulm anbietet. Zudem soll es den einsendenden Fachärzten und Fachärztinnen detailliert Informationen bezüglich der Anforderungen an das benötigte Material, bspw. der Menge und Vorbehandlung an die Hand geben, da diese signifikant die Qualität des Untersuchungsergebnisses beeinflussen.

2. Erläuterung

Erläuterung der in der VA genutzten Abkürzungen stehen im übergeordneten Abkürzungsverzeichnis.

3. Geltungsbereich

BwKrhs Ulm – Abteilung XIII Pathologie

4. Verantwortung/Zuständigkeiten

Facharzt/Fachärztin (FA)

- Identifizierung der Analyseareale
- Erstellung des histologischen Befundberichts
- Einordnung von molekularpathologischen Ergebnissen in den histologischen Kontext
- Rücksprache mit den Einsendenden bez. Probenmaterial das nicht den Qualitätsanforderungen der Abteilung XIII Pathologie entspricht

Leitung Molekularpathologie (Leitung-MP)

- Festlegung der Vorgehensweise bei Probenmaterial das nicht den Qualitätsanforderungen der Abteilung XIII Pathologie entspricht
- Rücksprache mit den Einsendenden bezüglich
- Probenmaterial das nicht den Qualitätsanforderungen der Abteilung XIII Pathologie entspricht
- Erstellung des molekularpathologischen Ergebnisberichts

5. Verfahren / Vorgehensweise

5.1. Leistungskatalog Molekularpathologie

Im Folgenden sind die in der Abteilung XIII Pathologie durchgeführten molekularpathologischen Untersuchungen sowie Angaben zur Methodik und der Indikation aufgeführt:

5.1.1 Mutationsanalysen / genomweite Biomarker / NG-Panelsequenzierung

Nachweis	Methodik	Indikation
523 Gene, Nachweis von SNV, MNV, Deletionen, Insertionen. Genomweite Marker: TMB und MSI.	Hybrid-Capture-basierte massive Parallelsequenzierung, Ausgangsmaterial: DNA (TSO500)	Entitätsübergreifend, v.a. solide Tumoren/ metastasierte Tumoren, z.B. NSCLC, gastrales Adenokarzinom, Pankreaskarzinom, Prostatakarzinom, Ösophaguskarzinom
Hotspot-Regionen von 50 Onkogenen und Tumorsuppressorgenen	Amplikon-basierte massive Parallelsequenzierung (Hotspot)	Entitätsübergreifend, z.B. Colorektales Adenokarzinom, Schilddrüsenkarzinom, malignes Melanom
BRCA1/BRCA2	Amplikon-basierte massive Parallelsequenzierung	Entitätsübergreifend, z.B. Pankreaskarzinom, Prostatakarzinom, Ovarialkarzinom

5.1.2 Methylierungsanalysen

Nachweis	Methodik	Indikation
MGMT-Promotermethylierung	Bisulfitkonversion/Pyrosequenzierung	Glioblastom
MLH1-Promotermethylierung	Bisulfitkonversion/Pyrosequenzierung	Ausschluss HNPCC

5.1.3 Klonalitätsanalysen

Nachweis	Methodik	Indikation
IGH-Analyse (VH-JH Fr1, Fr2, Fr3, DH-JH)	Multiplex-PCR Kapillargelelektrophorese	+ V.a. B-Zell-Lymphom
IGK-Analyse	Multiplex-PCR Kapillargelelektrophorese	+ V.a. B-Zell-Lymphom
TCR γ -Analyse	Multiplex-PCR Kapillargelelektrophorese	+ V.a. T-Zell-Lymphom
TCR β -Analyse	Multiplex-PCR Kapillargelelektrophorese	+ V.a. T-Zell-Lymphom

5.1.4 Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse

Nachweis	Methodik	Indikation
13 Mikrosatellitenmarkerregionen	Multiplex-PCR Kapillargelelektrophorese	Mikrosatelliteninstabilität im kolorektalen Karzinom, Endometriumkarzinom, Magenkarzinom

5.1.5 Erregernachweise

Nachweis	Methodik	Indikation
H. pylori + Resistenz gegen Fluorchinolone und Clarithromycin	PCR/Reverse Hybridisierung	B-Gastritis
M. tuberculosis Komplex + Resistenz gegen Isoniacid und Rifampicin	PCR/Reverse Hybridisierung Real-Time-PCR	V.a. Tuberkulose, Osteomyelitis
11 parodontopathogene Markerkeime (u.A. A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis, T. forsythia, T. denticola und P. intermedia)	PCR/Reverse Hybridisierung	Parodontose
HPV Nachweis+Typisierung	PCR/Reverse Hybridisierung	V.a. Screening, Zervixkarzinom, Oropharynxkarzinom
STD (Erreger sexuell übertragbarer Krankheiten) U.a. Chlamydia trachomatis Neisseria gonorrhoeae Treponema pallidum	PCR/Reverse Hybridisierung	V.a. Syphilis, Gonorrhoe, Urethritis, Konjunktivitis
HSV1/HSV2	Real-Time-PCR	HSV-Infektion, Ösophagitis
CMV	Real-Time-PCR	Ausschlussdiagnose bei Colitis Ulcerosa, Morbus Crohn
EBV	Real-Time-PCR	Mononukleose

5.1.6 FISH-Analysen

Nachweis	Methodik	Indikation
ALK/EML4-Translokation	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung	V.a. NSCLC
ROS-Translokation	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung	V.a. NSCLC
RET-Translokation	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung	NSCLC, Schilddrüsenkarzinom
ERBB2-Amplifikation	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung	V.a. Mamma-Karzinom, Magen-Karzinom
MET-Amplifikation	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung	V.a. NSCLC, Magen- Karzinom u.a.

1p/19q-Codeletion	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung	Oligodendrogliom
TRK-Translokationen	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung	u.a. NSCLC
EGFR-Amplifikation	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung	solide Tumoren
EWSR1-Translokation	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung	V.a. Ewing-Sarkom
MYB-Translokation	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung	Adenoidzystisches Karzinom
c-MYC-Translokation	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung	V.a. Non-Hodgkin-Lymphom, Burkitt-Lymphom
FGFR1-Amplifikation	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung	V.a. NSCLC

5.2. Allgemeine Hinweise zu molekularpathologischen Untersuchungen

Für gewebebasierte molekularpathologische Untersuchungen bevorzugen wir Gewebeblöcke, von denen wir das für die jeweiligen Untersuchungen notwendige Material entnehmen können.

Selbstverständlich erfolgt der Umgang mit dem Probenmaterial mit höchster Sorgfalt. Bei extern eingesandten Proben wird das Geweberestmaterial den Einsendenden nach durchgeführter Analyse zurückgesandt. Wird das externe Gewebematerial für die Untersuchung vollständig aufgearbeitet, wird dies den Einsendenden mitgeteilt.

5.2.1 Störfaktoren

Molekularpathologische Untersuchungen stellen zumeist hochkomplexe Laboranalysen dar, deren Erfolg durch multifaktorielle Einflüsse entscheidend beeinflusst oder gar verhindert werden kann. Zu diesen gehören:

- Überfixierung
- Entkalkung
- Nekrose des Gewebes
- Bestrahlung des Tumors im Zuge einer Tumorthherapie
- PCR-inhibierende Substanzen in der Probe (z.B. Melanin, Hämoglobin etc.)

5.3. Spezifische Hinweise zu molekularpathologischen Untersuchungen

5.3.1 Mutations- und Methylierungsanalysen

Im Unterschied zu humangenetischen Fragestellungen, werden in der Pathologie die tumorspezifischen, d.h. somatischen, Veränderungen im Tumorgenom nachgewiesen. Dieser Umstand, und tumorbiologische Eigenschaften wie

Tumorheterogenität, sowie die eingesetzte Untersuchungsmethode beeinflussen signifikant die Nachweisgrenze des Analyten.

Nachweisgrenzen:

- ❖ NGS (Hybrid-Capture-basiert): 2,5% Allelfrequenz Sequenzvariante
- ❖ NGS (Amplicon-basiert): 3% Allelfrequenz Sequenzvariante
- ❖ Pyrosequenzierung: 5-10% Allelfrequenz Sequenzvariante

Dies bedeutet, dass möglichst Proben mit einem hohen Tumoranteil (wenn möglich >50%) ausgewählt werden sollten. Analysiert werden jedoch auch Gewebestücke mit weniger Tumoranteil. Für genomweite Biomarker wie TMB und MSI muss der Tumorzellgehalt der Probe >30% liegen. Proben mit einem Tumoranteil von <15% werden nur in Ausnahmefällen untersucht.

Benötigte Materialmenge:

- Je nach Größe des Gewebeareals 3 - 8 Schnitte (5µm)
- Optimales Volumen des Analyseareals: 0,1 - 2 cm³
- Empfohlener Tumoranteil im Analyseareal: > 50%

5.3.2 Spezifische Hinweise zur Klonalitätsanalyse

Die Lymphozytendifferenzierung ist durch charakteristische Umlagerungsprozesse der B- bzw. T-Zellrezeptorgene definiert. Eine nicht maligne Lymphozytenpopulation zeichnet sich durch eine Vielfalt an Umlagerungsprodukten aus, die statistisch einer Gauß-Verteilung unterliegen. Im Gegensatz dazu kommt es in malignen Lymphozytenpopulationen zu einer klonalen Anreicherung eines einzelnen Umlagerungsproduktes. Der Nachweis erfolgt mittels Multiplex-PCR mit nachgeschalteter, hochauflösender Kapillargelelektrophorese. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 10%, sodass der Anteil an suspekten Lymphozyten im zu untersuchenden Gewebestück in diesem Bereich liegen sollte.

5.3.3 Spezifische Hinweise zur Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse

Mutationen in oder Hypermethylierung von Promoterregionen der Gene des DNA-Reparatursystems führen zu einem Funktionsausfall dieser Proteine. In der Folge werden Fehler (v.a. in repetitiven Bereichen, sog. Mikrosatellitenregionen) bei der DNA-Replikation nicht korrigiert und häufen sich im Tumorgenom an. Der Nachweis erfolgt mittels Multiplex-PCR mit nachgeschalteter, hochauflösender Kapillargelelektrophorese. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 5%.

5.3.4 Spezifische Hinweise zur Erregerdiagnostik

Die von uns durchgeführten Erregernachweise erfolgen, mit Ausnahme der Untersuchung von gynäkologischen Zytologien und dem Nachweis von parodontopathogenen Keimen, ausschließlich gewebebasiert. Dies bedeutet, dass unsere Analysen grundsätzlich einem Verdünnungseffekt unterliegen, da wir, im Gegensatz zu mikrobiologischen Analysen, Gesamt-DNA aus einer Probe (humane DNA + Erreger-DNA) isolieren. In einem ersten Schritt erfolgt die spezifische Amplifikation der Erreger-DNA kombiniert mit nachgeschalteten Nachweismethoden.

Je nach Nachweismethode und Erreger können bei guter DNA-Qualität und einer ausreichenden Probenmenge <10 Erreger-Genkopien pro Ansatz detektiert werden.

5.3.5 Spezifische Hinweise zu FISH-Analysen

Für FISH-Analysen werden ebenfalls Gewebeproben mit ausreichendem Gewebematerial bevorzugt. Für externe Einsendende, die keine Gewebeproben einsenden können, gilt bei der Einsendung von Schnitten Folgendes zu beachten:

- Einsendung von mindestens 3 ungefärbten Schnitten
Hiervon wird ein orientierender HE-Schnitt oder ggf. eine immunhistochemische Färbung (z.B. HER2) angefertigt, zwei Schnitte werden für die FISH-Präparate benötigt
 - Schnittdicke 3 bis 3,5µm
 - Verwendung von Superfrost PLUS Objektträgern (Oberfläche sollte positiv geladen sein)
 - Schnitt muss ausreichende Menge an zu analysierendem Material enthalten (mind. 50 -100 Tumorzellen)
- Nicht verwendete Schnitte werden dem Einsender zurückgesandt.

5.4 Vorgehen bei Proben, die nicht den im Handbuch für Präanalytik definierten Anforderungen entsprechen

Da die Qualität und Aussagekraft der bei einer molekularpathologischen Untersuchung erhaltenen Ergebnisse stark von den präanalytischen Begebenheiten abhängt, werden die Einsendenden höflichst gebeten, sich an die genannten Hinweise und die Angaben im Handbuch für Präanalytik zu halten. So ziehen bspw. eine Überfixierung des Gewebes oder eine Entkalkung mit Säuren eine starke Beeinträchtigung der DNA-Qualität nach sich, die im extremsten Fall zu einer vollständigen Nichteignung der DNA für die geplante(n) Analyse(n) (bspw. starke Fragmentierung der DNA, Fixierartefakte) führen kann.

Grundsätzlich sind wir natürlich zum Wohle des Patienten oder der Patientin bemüht, Analysen auch an Material durchzuführen, das nicht unseren Anforderungen entspricht. Diese Möglichkeit möchten wir aber unbedingt auf Fälle begrenzen, für die eine Nutzung von Alternativmaterial ausgeschlossen oder eine Neugewinnung von Gewebematerial nicht vertretbar ist. In diesen Fällen äußern wir uns im Ergebnisbericht jedoch explizit zu Grenzen und Einschränkungen, ggf. auch der diagnostischen Wertigkeit, denen das erhaltene Ergebnis unterliegt.

Wird trotzdem Material eingesandt, das nicht den definierten Anforderungen entspricht, wird folgendermaßen vorgegangen:

5.4.1 Ungenügende Gewebemenge, abweichende Vorbehandlung (Fixierung/Entkalkung)

- Rücksprache mit den Einsendenden bezüglich Materialoptionen:
 - Ist Alternativmaterial vorhanden?
 - Ist ein weiterer Eingriff für Materialgewinnung geplant – mit der Aussicht auf geeigneteres Material?

- Gibt es ev. die Möglichkeit den Primärtumor zu untersuchen?

5.4.2 Einsendung in abweichendem Probengefäß

5.4.2.1 Analyse parodontopathogener Markerkeime

- Werden Abnahmespitzen für die Untersuchung von parodontopathogenen Markerkeimen nicht gemäß Angaben der Herstellenden des Kits eingesandt, sondern bspw. in Formalin, wird mit den Einsendenden Kontakt aufgenommen, um die Gefahr des dadurch entstandenen Verdünnungseffekts zu besprechen. Die Analyse wird trotzdem durchgeführt; das Ergebnis entsprechend kommentiert.

5.4.2.2 Gynäkologische Zytologien

- Molekularpathologische Untersuchungen an gynäkologischen Zytologien werden bei uns nur an Dünnschicht (Monolayer)-Zytologien durchgeführt. Für konventionelle Exfoliativzytologien stehen bisher keine etablierten Verfahren zur DNA-Isolierung zur Verfügung und werden nicht bearbeitet. Dies wird dem einsendenden Gynäkologen mitgeteilt.

6. Mitgeltende Unterlagen

- QM-Handbuch Abteilung XIII Pathologie, Teil 2.1, 2.2
- QMH Handbuch für Präanalytik
- VA Validierung und Verifizierung von molekularpathologischen Untersuchungsmethoden
- VA Validierung und Verifizierung von FISH-Untersuchungsmethoden
- VA Erregernachweis
- VA PCR-basierte Analysen von somatischen genetischen Alterationen
- VA Ergebnisberichterstellung
- VA Umgang mit diskrepanten Ergebnissen und Problemevaluation
- VA Befundübermittlung kritischer Untersuchungsergebnisse
- VA Probenbehandlung allgemein
- VA Identifikation und Rückverfolgbarkeit
- VA Prozess- und Prüfmittelüberwachung
- VA Datenschutz

7. Dokumentation

Alle Dokumente sind im Bereich QM mindestens 10 Jahre aufzubewahren; für Dokumente, die Daten von Patienten und Patientinnen enthalten, gelten die gesetzlichen Aufbewahrungsfristen.

8. Verteiler

Alle im Verteiler: QM-Dokumentation aufgeführten Personen.



9. Anlagen

- -