

1. Zweck

Dieses Dokument gibt einen Überblick über das molekularpathologische Leistungsspektrum, das die Abteilung XIII Pathologie des BwKrhs Ulm anbietet. Zudem soll es den einsendenden Fachärzten 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.

Zur Vereinfachung wird jeweils die männliche Form der Personenbezeichnung verwendet.

3. Geltungsbereich

BwKrhs Ulm – Abteilung XIII Pathologie

4. Verantwortung/Zuständigkeiten

Facharzt (FA)

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

5. Verfahren / Vorgehensweise

5.1. Leistungskatalog Molekularpathologie

Im Folgenden sind die in der Sektion Molekularpathologie durchgeführten Untersuchungen sowie Angaben zur Methodik und der Indikation aufgeführt:

5.1.1 Mutationsanalysen

| Nachweis | Methodik | Indikation |
|--|---|---|
| KRAS-Mutationsanalyse (Exon 2, 3 und 4) | PCR/Pyrosequenzierung | Kolorektales Karzinom, NSCLC u.a. |
| NRAS-Mutationsanalyse (Exon 2, 3 und 4) | PCR/Pyrosequenzierung PCR/Reverse Hybridisierung | Kolorektales Karzinom, malignes Melanom |
| BRAF-Mutationsanalyse (Exon 15) | PCR/Pyrosequenzierung mutationsspezifische Endpunkt-PCR/Reverse Hybridisierung | Kolorektales Karzinom, NSCLC, Melanom, Schilddrüsenkarzinom |
| EGFR-Mutationsanalyse (Exon 18, 19, 20 und 21) | PCR/Pyrosequenzierung | NSCLC |
| IDH1-2 Mutationsanalyse | ARMS-RT-PCR | Gliome, Cholangiozelluläres Karzinom |
| EGFR-T790M-Mutationsanalyse aus Blut | ARMS-RT-PCR | NSCLC |

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 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 |

5.1.5 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 dem Einsender natürlich nach durchgeführter Analyse zurückgesandt. Wird das externe Gewebematerial für die Untersuchung vollständig aufgearbeitet, wird dies dem Einsender 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, beschäftigt sich die Pathologie ausschließlich mit tumorspezifischen, d.h. somatischen, Veränderungen im Tumorgenom. Dieser Umstand, und tumorbiologische Eigenschaften wie Tumorerheterogenität, sowie die eingesetzte Untersuchungsmethode beeinflussen

signifikant die Nachweisgrenze des Analyten. Allen Nachweismethoden gemein ist eine vorangeschaltete Amplifikation des zu analysierenden DNA-Bereiches, kombiniert mit unterschiedlichen Nachweismethoden, die maßgeblich die Nachweisgrenze des Systems bestimmen:

- ❖ Pyrosequenzierung: 5-10% Allelfrequenz Sequenzvariante
- ❖ ARMS Real-Time-PCR: <5% Allelfrequenz Sequenzvariante
- ❖ Mutationsspezifische Endpunkt-PCR: < 5% Allelfrequenz Sequenzvariante

Dies bedeutet, dass möglichst Proben mit einem hohen Tumoranteil (wenn möglich >50%) ausgewählt werden sollten. Analysiert werden jedoch auch Gewebeblöcke mit nur 20-30% Tumoranteil. Proben mit einem Tumoranteil von <15% werden nur in absoluten Ausnahmefällen untersucht.

Benötigte Materialmenge:

- Je nach Größe des Gewebeareals 3 - 8 Schnitte (10µm)
- Optimale Größe des Analyseareals: 0,5 - 1 cm²
- 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. Bezüglich Materialmenge und Störfaktoren gelten die bereits erwähnten Angaben. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 10%, sodass der Anteil an suspekten Lymphozyten im zu untersuchenden Gewebekblock in diesem Bereich liegen sollte.

5.3.3 Spezifische Hinweise zur Erregerdiagnostik

Die von uns durchgeführten Erregernachweise erfolgen, mit Ausnahme der Untersuchung von gynäkologischen Zytologien und dem Nachweis von parodthopathogenen Keimen, ausschließlich gewebebasiert. Dies bedeutet, dass unsere Analysen grundsätzlich einem Verdünnungseffekt unterliegen, da wir, im Gegensatz zu mikrobiologischen Analysen, immer Gesamt-DNA aus einer Probe (humane DNA + Erreger-DNA) isolieren. Analog zu Mutations- und Methylierungsanalysen erfolgt in einem ersten Schritt 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.

5.3.4 Spezifische Hinweise zu FISH-Analysen

Für FISH-Analysen werden ebenfalls Gewebelöcke mit ausreichendem Gewebematerial bevorzugt. Für externe Einsender, die keine Gewebelöcke 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 Einsender 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 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 dem Einsender 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 von zellfreier (cf-)DNA aus Vollblut

- Unbedingte Rücksprache mit dem Einsender. Die Analyse kann nur regelhaft erfolgen, wenn zur Blutentnahme die speziell für cf-DNA konzipierten „Cell-Free DNA BCT®CE der Firma Streck (oder gleichwertige Gefäße anderer Hersteller) verwendet werden, da diese ein Konservierungsreagenz für kernhaltige Blutkörperchen enthalten. Eine Analyse wird nur in absoluten Ausnahmefällen in anderweitig eingesandtem Vollblut durchgeführt.

5.4.2.2 Analyse parodontopathogener Markerkeime

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

5.4.2.3 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 Patientendaten enthalten, gelten die gesetzlichen Aufbewahrungsfristen.

8. Verteiler

Alle im Verteiler: QM-Dokumentation aufgeführten Personen.

9. Anlagen

- -