

Handreichung

Validierung Molekularpathologie

Disclaimer

Das vorliegende Dokument wurde im Rahmen der Initiative „IVDR in der Molekularpathologie“ der Arbeitsgemeinschaft Molekularpathologie der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e. V. erstellt und soll eine Hilfestellung bei der Umsetzung von Validierungen auf Basis der Anforderungen der Europäischen Verordnung (EU) 2017/746 Art. 5 (5) sein. Das vorliegende Dokument hat keinen rechtsverbindlichen Charakter. Es dient ausschließlich als unverbindliche Orientierungshilfe zur Umsetzung der Verordnung (EU) 2017/746 (IVDR) in Gesundheitseinrichtungen, die Produkte selbst herstellen und anwenden. Die Inhalte geben den Kenntnisstand zum Zeitpunkt der Erstellung wieder und sind nicht als abschließend oder vollständig zu verstehen. Eine Haftung der Autor*innen für etwaige Fehler, Auslassungen oder Folgeschäden ist ausgeschlossen. Diese Handreichung wurde im Rahmen einer Arbeitsgruppe unter Mitwirkung verschiedener Beteiligter entwickelt. Sie vereint unterschiedliche Perspektiven und fachliche Expertise. Daraus resultierend kann es zu sprachlichen Unterschieden in Text kommen, die die Vielfalt der Perspektiven widerspiegeln.

Die hier vorliegende Handreichung gliedert sich in folgende Teile: Zunächst wird eine allgemeine Einleitung gegeben zu den Anforderungen der EU-Verordnung (EU) 2017/746 Art. 5 (5) im Rahmen einer Validierung. Anschließend wird der Aufbau eines Validierungsplanes und des Validierungsberichtes dargestellt. Zunächst wird eine Checkliste aufgeführt, die die wesentlichen Punkte im Rahmen einer Validierung berücksichtigt. Diese beinhaltet allgemeine Angaben und Erläuterungen (z. B. Projekttitel, Validierungsgrund, Zweckbestimmung etc.), dann das Material, die Validierungsergebnisse und die Leistungsbewertung und am Ende die zusammenfassenden Dokumente (z. B. mitgeltende Unterlagen, Freigabe etc.). Im Anschluss an diese Checkliste wird eine Vorlage

zum Validierungsprotokoll mit detaillierten Erklärungen aufgeführt. Im Anhang dieser Handreichung wird praxisorientiert und detailliert auf die beispielhafte Berechnung der minimalen Probenzahl eingegangen. Hierbei handelt es sich um Empfehlungen, die nicht verpflichtend sind, sondern als Konsens dieser Handreichung dargestellt werden. Zusätzlich wird in verschiedenen Anhängen auf die Validierung bei der Erregerdiagnostik, der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), den Klonalitätsanalysen, der Analyse von Mikrosatelliteninstabilität, den Methylierungsanalysen, der Mutationsanalyse von Einzelgenen und Multigenen, der Analyse komplexer Biomarker, der Fusionsanalyse von Einzelgenen und der Fusionsanalyse Multigen eingegangen.

Autorenliste

Michaela Angelika Ihle¹, Ivana Bratic Hench², Jan Budczies³, Andreas Eckelt⁴, Sandra Ehrhardt^{5, 6}, Laura Esser⁷, Kim Falkenberg⁸, Sebastian Grenz⁹, Sylvia Herold¹⁰, Katharina Ilm^{11, 12}, Andy Kahles³, Sabine Merkelbach-Bruse¹, Christine Neuhaus⁷, Kerstin Rehm⁹, Johannes Schmidpeter¹³, Udo Siebolts¹, Ana Terron Kwiatkowski¹¹, Anna-Lena Volckmar³, Ginette Vornberger¹⁴, Andrea Waltenberger¹⁵, Anna-Lena Wulf¹⁶

- ¹ Universität zu Köln, Medizinische Fakultät und Uniklinik Köln, Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, Köln, Deutschland
- ² Universitätsspital Basel, Institut für Medizinische Genetik und Pathologie, Basel, Schweiz
- ³ Universitätsklinikum Heidelberg, Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, Heidelberg, Deutschland
- ⁴ IVDRconsulting UG, Niederkassel, Deutschland
- ⁵ Universitätsmedizin Halle, Department für Labormedizin, Abteilung III, Halle, Deutschland
- ⁶ Universitätsmedizin Halle, Institut für Pathologie, Halle, Deutschland
- ⁷ Labor Dr. Wisplinghoff, Köln, Deutschland
- ⁸ Universitätsklinikum Münster, Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie, Münster, Deutschland
- ⁹ GENOPATH, überörtliche Teil-Berufsausübungsgemeinschaft für Molekularpathologie GbR, Bonn, Deutschland
- ¹⁰ Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der Technischen Universität Dresden, Institut für Pathologie, Dresden, Deutschland
- ¹¹ Technische Universität München, Institut für Pathologie, TUM School of Medicine and Health, München, Deutschland
- ¹² Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie QuIP GmbH, Berlin, Deutschland
- ¹³ Teilgemeinschaftspraxis Molekularpathologie Südbayern, München, Deutschland
- ¹⁴ Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Institut für Pathologie, Würzburg, Deutschland
- ¹⁵ PIZ - Patho Im Zentrum GmbH, Molekularpathologie GIZ - Gene Im Zentrum, St. Pölten, Österreich
- ¹⁶ Universitätsklinikum Bonn (AÖR), Institut für Pathologie, Bonn, Deutschland



Inhaltsverzeichnis

Disclaimer	1	3.3.4. Präzision	12
Autorenliste	2	3.3.5. Nachweisgrenze – Limit of Detection (LOD)	13
1. Einleitung	4	3.3.6. Erfassungsgrenze – Limit of Blank (LOB) (optional)	13
2. Checkliste zum Aufbau der Validierungsdokumentation	8	3.3.7. Definition der Testgrenzwerte (Cut-off)	13
2.1. Allgemeine Angaben und Erläuterungen	8	3.3.8. Leistungsbewertung	13
2.2. Materialien	8	3.3.9. Besonderheiten	13
2.3. Validierungsergebnisse und Leistungsbewertung	8	3.4. Zusammenfassende Dokumente	13
2.4. Zusammenfassende Unterlagen	8	3.4.1. Mitgeltende Unterlagen	13
2.5. Anhang	8	3.4.2. Archivierung	13
3. Vorlage eines Validierungsplanes mit detaillierten Erklärungen	9	3.4.3. Freigabe (inkl. Zusammenfassung)	13
3.1. Allgemeine Angaben und Erläuterungen	9	3.4.4. Literaturangabe	13
3.1.1. Projekttitel	9	3.4.5. Anhang	13
3.1.2. Versionsnummer	9	4. Danksagung	14
3.1.3. Erstellt von	9	5. Referenzen	14
3.1.4. Erstelldatum	9	6. Abkürzungen	15
3.1.5. Validierungsgrund	9	7. Anhang	17
3.1.6. Zweckbestimmung	10	I. Anhang: Referenzmaterial für die Validierung verschiedener Untersuchungsmethoden	17
3.1.7. Risikoklassifikation	10	II. Anhang: Berechnung der Probenanzahl für die Validierung einer neuen Methode	19
3.1.8. Leistungsmerkmale	11	III. Anhang: Validierung der Erregerdiagnostik	20
3.1.9. Beschreibung des Nachweisverfahrens	11	IV. Anhang: Validierung von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und chromogener In-situ-Hybridisierung (CISH)	21
3.1.10. Ausgangsmaterial	11	V. Anhang: Validierung von Klonalitätsanalysen mittels Fragmentlängenanalyse	22
3.1.11. Angaben über die korrekte Vorbereitung der Proben	11	VI. Anhang: Validierung der Mikrosatelliteninstabilität (MSI)	23
3.1.12. Ergebnisinterpretation	11	VII. Anhang: Validierung der quantitativen <i>MLH1</i> -Promotor-Methylierungsanalyse durch Real-Time-qPCR	24
3.1.13. Qualitätssicherung für das validierte Produkt	11	VIII. Anhang: Validierung der Einzelgenmutationsanalyse	25
3.1.14. Umwelt- und Sicherheitsmaßnahmen	11	IX. Anhang: Validierung von Multigenmutationsanalysen	26
3.1.15. Mögliche Risiken	11	X. Anhang: Validierung von Multigenfusionsanalysen	28
3.2. Materialien	11	XI. Anhang: Validierung von genomweiten Biomarkern mit quantitativer Komponente	31
3.2.1. Metrologische Rückführbarkeit	11	Impressum	33
3.2.2. Reagenzien	11		
3.2.3. Geräte	12		
3.2.4. Software	12		
3.2.5. Referenzmaterial/-kollektiv	12		
3.2.6. Kontrollen	12		
3.3. Validierungsergebnisse und Leistungsbewertung	12		
3.3.1. Sensitivität	12		
3.3.2. Spezifität	12		
3.3.3. Richtigkeit	12		

1. Einleitung

In-vitro-Diagnostika (IVD) umfassen in der Pathologie u. a. Nachweismethoden für Biomarker im Rahmen prognostischer, diagnostischer und prädiktiver Testung. IVD müssen vor ihrem Einsatz in der Routinediagnostik für ihren Einsatzzweck verifiziert oder validiert sein. Die Verifizierung prüft, ob ein Produkt korrekt gemäß den Spezifikationen umgesetzt wurde. Bei der Validierung wird geprüft, ob das Produkt für den vorgesehenen Zweck (Zweckbestimmung) geeignet ist und die tatsächlichen Bedürfnisse des Nutzers erfüllt. Diese Handreichung beschäftigt sich vorrangig mit

der Validierung eines Produktes im Rahmen der IVDR, umfasst dabei jedoch auch Aspekte der Verifizierung, soweit diese im Kontext der Validierung erforderlich sind. Eine detaillierte Unterscheidung oder separate Betrachtung der beiden Begriffe erfolgt in diesem Dokument nicht generell.

Um die Verifizierungs- und Validierungsaktivitäten in Abhängigkeit vom zugrunde liegenden „IVD-Typus“ definieren zu können, unterteilen wir in dieser Handreichung die IVD in drei Kategorien (I bis III):

Tabelle 1:

Kategorisierung IVDR-konformer In-vitro-Diagnostika, die in pathologischen Instituten in der Routinediagnostik zum Einsatz kommen. Die Kategorisierung kann als Grundlage für die Planung des Validierungs- und Verifizierungsumfanges dienen

Kategorie	Hersteller	Label	Verwendung		Als
			Entsprechend der Zweckbestimmung des Herstellers	Entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers	
I	Wirtschaftsakteur	CE	✓	✓	CE-IVD
IIa	Wirtschaftsakteur	CE	✓	✗	IH-IVD
IIb	Wirtschaftsakteur	CE	✗ ¹⁾	✓	
IIc	Wirtschaftsakteur	RUO	✗ ¹⁾	✗ oder ✓	
III	Gesundheitseinrichtung	Inhouse	✓	✓	

¹⁾Gesundheitseinrichtung muss eine neue Zweckbestimmung definieren.

Bei der Verwendung von CE-IVD entsprechend der vom Hersteller gegebenen Zweckbestimmung und entsprechend der Gebrauchsanweisung (Kategorie I; Tabelle 1) ist eine Verifizierung der vom Hersteller angegebenen Qualitätsparameter notwendig (Abbildung 1). Eine Validierung ist dagegen bei der Verwendung von Inhouse-in-vitro-

Diagnostika (IHIVD) notwendig, was folgende Assay-Arten umfasst: CE-IVD-Testsysteme, genutzt mit Abweichungen von der Gebrauchsanweisung/Zweckbestimmung, Diagnostika für Forschungsfragestellungen (research use only: RUO) (Kategorie II) sowie von der Pathologie selbst entwickelte IVD (Kategorie III).

IVD-Kategorie	I	Ila	Ilb	Ilc	III
Validierungsaufwand					
	CE-IVD	CE-IVD	CE-IVD	IH-IVD RUO	eigenentwickelt
Verwendung gemäß Zweckbestimmung	✓	✓	-	-	✓
Verwendung gemäß Gebrauchsanweisung	✓	-	✓	✓	✓
Zweckbestimmung durch Hersteller durch uns Gebrauchsanweisung Arbeitsanweisung	✓ ✓✓	✓ (✓) ✓	(✓) ✓ ✓✓	(✓) ✓ ✓✓	✓ ✓
Validierung	Validierung: - durch Hersteller	Validierung: - durch Hersteller - Robustheit: Einfluss der Veränderungen ermitteln und bewerten -> ggfs. Risikoanalyse	Validierung: - durch Hersteller - Robustheit: Einfluss der Veränderungen ermitteln und bewerten -> ggfs. Risikoanalyse	Validierung: u.a.: - ggf. Validierungsparameter von Hersteller vorhanden - Sensitivität - Spezifität - Richtigkeit - Präzision - Reproduzierbarkeit - ... -> ggfs. Risikoanalyse	Validierung: u.a.: - Sensitivität - Spezifität - Richtigkeit - Präzision - Reproduzierbarkeit - ... -> ggfs. Risikoanalyse
Verifizierung	Verifizierung: Leistungsparameter des Herstellers - Richtigkeit - Präzision	Verifizierung: Leistungsparameter des Herstellers - Richtigkeit - Präzision	Verifizierung: Leistungsparameter des Herstellers - Richtigkeit - Präzision	Verifizierung: Leistungsparameter des Herstellers - Richtigkeit - Präzision	
	kontinuierliche Verifizierung/Qualitätskontrollen: - Mitführen von Kontrollen - Ringversuche - interne Audits - Fehlermanagement - regelmäßige Aktualisierungen der Risikomanagementakte (IH-IVD)				

Abbildung 1:

Verifizierungs- und Validierungsaufwand in Abhängigkeit von der zugrunde liegenden IVD-Kategorisierung (Tabelle 1)

Kategorie II der IH-IVD sind einerseits vom Hersteller validierte CE-IVD, die nur an ganz klar definierten Stellen eine Abweichung von der Gebrauchsanweisung oder Zweckbestimmung aufweisen (Kategorie Ila: z. B. Abweichungen in Inkubationszeiten, Verdünnungen oder Inputmengen; oder Kategorie Ilb: z. B. Einsatz des IVD für abweichendes Probenmaterial (FFPE) oder Entitäten). Hier stellt es einen unverhältnismäßigen Aufwand an Ressourcen und Arbeitsstunden dar, den gesamten Ablauf neu zu validieren, da dies bereits durch den Hersteller geleistet wurde. Es sollten lediglich die vom Hersteller vorgegebenen Qualitätsparameter verifiziert und der Einfluss der vorgenommenen Änderungen ermittelt, beschrieben und beurteilt werden. Andererseits fallen in Kategorie II auch Testverfahren, die mit einem vom Hersteller nicht ausreichend validierten System durchgeführt werden (Kategorie Ilc: z. B. RUO-Kits ohne CE-IVD-Markierung). Je nach angegebenen Vorinformationen und Leistungsmerkmalen durch den Hersteller (z. B. Sensitivität, Spezifität) müssen diese in der Einrich-

tung verifiziert oder validiert werden. Eine vollumfängliche Validierung wird dabei nur notwendig, wenn vom Hersteller des RUO keine Angaben über die Qualitätsparameter des Testverfahrens vorgegeben werden.

Kategorie III der IH-IVD sind schlussendlich Nachweisverfahren, die beispielsweise nach Vorlage einer Veröffentlichung im Labor rekonstruiert oder von der Pathologie selbst entwickelt wurden und die somit in großem Umfang und in allen Punkten von Grund auf validiert werden. In allen Fällen wird der Umfang der Verifizierung oder Validierung im jeweiligen Validierungsbericht geplant, beschrieben und begründet.

Genaue Vorgaben zur Validierung werden in der Verordnung (EU) 2017/746 aufgrund der hohen Diversität der verwendeten IVD nicht gemacht; geprüft werden sollen „die Analyseleistung, wie analytische Sensitivität, analytische Spezifität, Richtigkeit (Verzerrung), Präzision (Wiederhol-

barkeit und Reproduzierbarkeit), Genauigkeit (als Ergebnis von Richtigkeit und Präzision), Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen, Messbereich, Linearität, Cut-off, einschließlich der Bestimmung geeigneter Kriterien für die Probennahme und die Behandlung und Kontrolle der bekannten relevanten endogenen und exogenen Interferenzen und Kreuzreaktionen, sowie [...] die klinische Leistung, wie diagnostische Sensitivität, diagnostische Spezifität, positiver prädiktiver Wert, negativer prädiktiver Wert, Likelihood-Verhältnis und erwartete Werte bei nicht betroffenen und betroffenen Bevölkerungsgruppen“ (Verordnung (EU) 2017/746, Anhang I Kapitel II).

Hierbei ist zu beachten, dass vonseiten der Pathologie eine klinische Leistungsbewertung wie positiver (PPV) und negativer (NPV) prädiktiver Wert kaum möglich ist, da die (longitudinale) Betreuung von Patient*innen den behandelnden Ärzt*innen obliegt. In der Pathologie liegen in der Regel nur stichprobenartig Befunde und Informationen über ein Ansprechen auf Therapien vor (beispielsweise im Rahmen von erneuten Biomarkernachweisen unter Therapieresistenz). Es kann daher im Rahmen der Routinediagnostik nur ein Abgleich mit publizierten Daten zur Häufigkeit von Biomarkern/Erregern in bestimmten vergleichbaren Populationen erfolgen. Dieser sollte aber Teil der Validierung sein und bei Biomarkern mit hoher klinischer Bedeutung als Leistungsmerkmal auch regelmäßig in geeigneten Abständen überprüft werden. Wenn bestimmte Leistungsanforderungen aus Anhang I nicht beachtet werden, muss dies begründet werden. Hier kann eine entsprechende Argumentation gemeinsam erarbeitet und geteilt werden. Außerdem ist zu beachten, dass

in Einzelfällen (z. B. Geräteausfall, seltene Erkrankungen/Varianten mit stark limitierter Verfügbarkeit von Kontrollproben) die Freigabe von Produkten ohne eine vollständig abgeschlossene Validierung erfolgen kann. Die Validierung erfolgt dann im Anschluss an die Freigabe. Hierbei sollten signifikante Abweichungen vom Validierungsplan schriftlich dokumentiert werden und im Rahmen des Risikomanagements begutachtet werden¹.

Die Akzeptanzkriterien für eine erfolgreiche Validierung sollten vorab schriftlich im Validierungsplan definiert sein. Hierbei sind Faktoren wie z. B. die zu erreichende Sensitivität und Spezifität, Coverage, Allelfraktion und die Anzahl der detektierten Subtypen zu berücksichtigen. Falls vorhanden, kann hierbei auch auf aktuelle Literatur, Leitlinien oder Herstellerangaben zurückgegriffen werden. Zusätzlich sollte schriftlich festgelegt sein, was passiert, wenn diese Akzeptanzkriterien nicht erreicht werden.

Was genau zu einem einzelnen Produkt zählt, ist nicht vorgegeben: Theoretisch ist eine Einteilung von einzelnen Schritten im technischen Ablauf (z. B. Nukleinsäureextraktion – Qualitätskontrolle – Sequenzierung – Bioinformatische Auswertung – Molekularpathologische Begutachtung und Befunderstellung oder Nukleinsäureextraktion – Qualitätskontrolle – Erregernachweis – Molekularpathologische Begutachtung und Befunderstellung) genauso denkbar wie eine Bewertung des Gesamtvorganges als IH-IVD (Produktgruppe). Bei einer Unterteilung in einzelne Schritte ist das Austauschen einzelner Techniken zum Beispiel bei verbesserter Qualitätskontrolle oder besser skalierbaren Ansätzen leichter, dafür müssen aber alle einzelnen Bestand-

teile der Prozesskette zeit- und kostenaufwendig validiert werden. Die Auswahl des Referenzmaterials wird ebenfalls durch die Inhalte der Produktgruppe definiert: Wenn z. B. die Nukleinsäureextraktion Teil der Produktgruppe ist, sollte als Referenzmaterial auch das Ausgangsmaterial genutzt werden (z. B. FFPE-Probe), wohingegen bei einer Produktgruppe mit separater Nukleinsäureextraktion als Einzelprodukt auch extrahierte Nukleinsäure zur Validierung eingesetzt werden kann. Die Beurteilung, ab welcher Abweichung (Softwareupdate, neues Gerät mit ähnlichen Eigenschaften etc.) eine erneute Validierung oder nur eine Verifizierung benötigt wird, obliegt dabei der anwendenden Pathologie. Die Stichprobenmenge wird durch die Fragestellung bedingt. Bei der Etablierung oder Validierung einer komplett neuen Methode ist eine größere Fallzahl notwendig als z. B. bei der Erweiterung eines bestehenden Panels. Je nach Biomarkernachweis können sich ebenfalls die Fallzahlen unterscheiden (s. Anhänge I bis XI). Wenn eine Untersuchung in der Erregerdiagnostik nur eine Ja/Nein- (qualitative) Antwort generiert, ist eine geringere Stichprobenanzahl erforderlich als beispielsweise bei der Differenzierung verschiedener Subtypen. Die Anzahl positiver und negativer Fälle im Referenzkollektiv ist ebenfalls von der Fragestellung abhängig. Methodisch bedingt ist die Anzahl falsch positiver und die Anzahl falsch negativer Proben variabel. Ein Referenzkollektiv für die Erregerdiagnostik sollte daher, wenn möglich, einen höheren Anteil negativer Proben enthalten (z. B. pos./neg. 50/50), ein Referenzkollektiv für die Mutationsanalyse einen höheren Anteil von Proben mit einer spezifischen Mutation

(z. B. pos./neg. 80/20). Die Stichprobenmenge muss also für jede der oben aufgeführten Untersuchungsmethoden separat festgelegt werden. Gegebenenfalls kann die Stichprobenmenge und ihre Zusammensetzung durch eine*n Biostatistiker*in überprüft werden.

Im Folgenden wird im Rahmen dieser Handreichung der Aufbau eines Validierungsplanes und des Validierungsberichtes dargestellt. Zunächst wird in einer Checkliste aufgeführt, welche der wesentlichen Punkte im Rahmen einer Validierung zu berücksichtigen sind. Dies beinhaltet allgemeine Angaben und Erläuterungen (z. B. Projekttitel, Validierungsgrund, Zweckbestimmung etc.), dann das Material, die Validierungsergebnisse und die Leistungsbewertung und am Ende die zusammenfassenden Dokumente (z. B. mitgeltende Unterlagen, Freigabe etc.). Im Anschluss an diese Checkliste wird eine Vorlage zum Validierungsprotokoll mit detaillierten Erklärungen aufgeführt. Im Anhang dieser Handreichung wird praxisorientiert und detailliert auf die beispielhafte Berechnung der minimalen Probenzahl eingegangen. Hierbei handelt es sich um Empfehlungen, die nicht verpflichtend sind, sondern als Konsens dieser Handreichung dargestellt werden. Zusätzlich wird in verschiedenen Anhängen auf die Validierung bei der Erregerdiagnostik, der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), den Klonalitätsanalysen, der Mikrosatelliteninstabilität, den Methylierungsanalysen, der Mutationsanalyse von Einzelgenen und Multigenen, komplexer Biomarker, der Fusionsanalyse von Einzelgenen und der Fusionsanalyse Multigen eingegangen.

2. Checkliste zum Aufbau der Validierungsdokumentation

2.1. Allgemeine Angaben und Erläuterungen

Projekttitel
Versionsnummer
Erstellt von
Erstelldatum
Validierungsgrund
Zweckbestimmung
Risikoklassifikation
Leistungsmerkmale
Beschreibung des Nachweisverfahrens
Ausgangsmaterial
Angaben über die korrekte Vorbereitung der Proben
Befundinterpretation
Qualitätssicherung
Umwelt- und Sicherheitsmaßnahmen
Mögliche Risiken

2.2. Materialien

Metrologische Rückführbarkeit
Reagenzien
Geräte
Software
Referenzmaterial/-kollektiv
Kontrollen

2.3. Validierungsergebnisse und Leistungsbewertung

Analytische Sensitivität
Analytische Spezifität
Richtigkeit
Präzision
Nachweisgrenze – Limit of Detection (LOD)
Definition der Testgrenzwerte (Cut-off)
Leistungsbewertung
Besonderheiten

2.4. Zusammenfassende Unterlagen

Archivierung
Freigabe (inkl. Zusammenfassung)
Literaturangabe

2.5. Anhang

3. Vorlage eines Validierungsplanes mit detaillierten Erklärungen

Im Allgemeinen sei darauf hingewiesen, dass bei der Erstellung des Validierungsprotokolls auch Verweise auf andere Dokumente möglich sind, sodass keine doppelte Dokumentation erfolgt. Dies hat zum Vorteil, dass bei Änderungen, die das Produkt betreffen, nur ein Dokument bearbeitet werden muss. Im Folgenden sind die einzelnen Punkte einer Validierung aufgeführt, Erläuterungen hierzu sind jeweils in roter Schrift zusammengefasst.

3.1. Allgemeine Angaben und Erläuterungen

3.1.1. Projekttitle

Jedem Validierungsprojekt wird ein entsprechender Projekttitle zugeteilt. Ergänzungen oder Revalidierungen können unter diesem Projekttitle unter Angabe der jeweiligen Versionsnummer vorgenommen werden.

3.1.2. Versionsnummer

Jedes Validierungsprojekt benötigt eine Versionsnummer. Erstvalidierungen erhalten die Versionsnummer 1. Es empfiehlt sich für alle Validierungsprojekte die Verwendung eines einheitlichen festgelegten Versionierungsschemas, z. B. Ergänzungen zum eigentlichen Validierungsprojekt erhalten eine Zusatzbezeichnung (Version 1.1.). Revalidierungen werden unter einer neuen Versionsnummer gelistet (Version 2).

3.1.3. Erstellt von

Namen und Funktionen der Mitarbeiter*innen, die ein Validierungsprojekt betreuen und für die Planung, Prozessierung, Auswertung und Dokumentation (Erstellen des Validierungsplanes und -reportes) zuständig sind.

3.1.4. Erstelldatum

Genaueres Datum der Erstellung der Validierungsdokumente (Validierungsplan und -report)

3.1.5. Validierungsgrund

Beispiele für den Validierungsgrund:

- Neueinführung des Nachweisverfahrens/der Methode (IH-IVD)
 - Neueinführung CE-IVD mit Abweichungen
 - Neueinführung RUO-Assay
 - Neueinführung IH-IVD-Assay
- Methodenerweiterung
- Sonstiges

3.1.6. Zweckbestimmung

Bei jeder Methoden- oder Gerätevalidierung muss die Zweckbestimmung der zu validierenden Methode oder des zu validierenden Gerätes eindeutig definiert sein (Abbildung 2). Bei CE-IVD-Kits und -Geräten entspricht die Zweckbestimmung der des Herstellers. Bei IH-IVD muss die Zweckbestimmung selbst formuliert werden unter Angabe der folgenden Kriterien:

- Spezifikation des Nachweises (Biomarker, Erreger, somatische Mutationen etc.)
- Enthaltene Produkttypen (Instrument, Kit, Kontrollmaterial, Software etc.)
- Ausgangsmaterial (FFPE, Blut etc.)
- Methodik (PCR, Real-Time-PCR, Pyrosequenzierung, NGS etc.)
- Indikation (prognostisch, diagnostisch, prädiktiv, Screening etc.)
- Anwender
- Art der Untersuchung (qualitativ/quantitativ/semiquantitativ)
- Art der Methode (automatisiert, semiautomatisiert, manuell)
- Gerätetyp
- Gegebenenfalls Patientenpopulation (Geschlecht, Alter etc.)

Ein Beispiel ist Abbildung 2 zu entnehmen.

3.1.7. Risikoklassifikation

Mit der Einführung der EU-Verordnung über In-vitro-Diagnostika (IVDR) sind die Anforderungen an das Qualitätsmanagementsystem und die technische Dokumentation gestiegen. Über die IVDR wird ein neues Klassifizierungssystem eingeführt, das sich in erster Linie an der Zweckbestimmung des jeweiligen Produktes orientiert. Die IVDR definiert hierbei vier Risikoklassen für IVD (Klasse A bis D), wobei Klasse D IVD mit einem hohen Risiko für eine lebensbedrohliche Erkrankung und einem großen Personenkreis inkludiert, während Klasse A IVD mit dem geringsten Risiko klassifiziert. In der Molekularpathologie werden hauptsächlich Produkte der Risikoklasse C verwendet (Produkte zum Nachweis von Infektionserregern und genetischen Veränderungen/Störungen, Produkte, die in der Krebsvorsorge, -diagnostik oder Stadieneinteilung eingesetzt werden, Produkte, die als therapiebegleitende Diagnostika Verwendung finden, Produkte zur Blutgruppenbestimmung oder Gewebetypisierung unter Berücksichtigung der Ausnahmen gemäß IVDR).

1. Produktname	„IH-IVD xyz“	„IH-IVD NGS Targeted Panel NSCLC“
2. IH-IVD-Kategorie	Kategorie I Kategorie II (a, b, c) Kategorie III	Kategorie II b
3. Art des IH-IVD	z. B.: Assay, Panel, Software, Gerät, Daten, ...	Assay, Gerät
4. Input/Untersuchungsmaterial	z. B.: FFPE-Material, Vollblut, Zystenpunktate, ...	Nukleinsäure (RNA und DNA) aus FFPE
5. Funktion/Zweck	z. B.: Nachweis von Pathogenen, voraussichtliche Wirkung einer Behandlung, Nachweis im Rahmen einer Differenzialdiagnostik, ...	Detektion von somatischen Aberrationen (Mutationen, Fusionen) mit Hybrid-Capture-basiertem NGS (Panelanalyse) zur Diagnose und als therapiebegleitendes Diagnostikum
6. Patientenpopulation	z. B.: Alter, Geschlecht, Kontraindikationen, ...	Erwachsene mit NSCLC
7. Indikation	z. B.: Entität, pathologischer Zustand, Krankheit, Verdacht, ...	NSCLC
8. Anwenderkreis	geschultes Laborpersonal	geschultes Laborpersonal
9. Art der Untersuchung	qualitativ/quantitativ Automatisiert/manuell ...	qualitative Analyse, semiautomatisiert

Abbildung 2:

Formulierung der Zweckbestimmung für Inhouse-in-vitro-Diagnostika (IH-IVD)

3.1.8. Leistungsmerkmale

Die Angabe der Leistungsmerkmale ist abhängig von den Testeigenschaften. Kriterien, die hier genannt werden können, sind im Folgenden aufgelistet:

- Angaben über die Gene oder Gensequenzen, die analysiert werden
- Angabe der Erreger, die nachgewiesen werden
- Angabe der verwendeten Referenzsequenz
- Angabe der erwarteten Allelfraktion oder der selbst definierten Richtwerte

3.1.9. Beschreibung des Nachweisverfahrens

Kurze, aber prägnante Erläuterung der zu validierenden Methode/des zu validierenden Gerätes (welche Methode, welches Testprinzip etc.) z. B. Prinzip Amplikon-basiertes NGS-Panel oder Hybrid-Capture-Verfahren, Prinzip Sanger-Sequenzierung, DNA-Isolationsmethode, Real-Time-PCR, In-situ-Hybridisierung etc.

3.1.10. Ausgangsmaterial

Beispiele für Ausgangsmaterialien, die im Rahmen der Validierung genutzt werden können:

- FFPE
- Plasma
- Blut
- Frischgewebe
- Abstriche
- Liquor
- Punktat

3.1.11. Angaben über die korrekte Vorbereitung der Proben

Angaben zur Präanalytik (z. B. welches Dissektionsverfahren, welches Extraktionsverfahren, welche DNA/RNA-Quantifizierungsmethode mit Angabe des Gerätes, welche Probenlagerung, welcher Tumorzellgehalt, welche Konzentration der Nukleinsäure, welches einsetzbare Volumen der Probe etc.)

3.1.12. Ergebnisinterpretation

Beispiele für Parameter, die für die Interpretation der Analyseergebnisse verwendet werden:

- Angaben über Schwellenwerte
- Definition positiv vs. negativ

3.1.13. Qualitätssicherung für das validierte Produkt

Teilnahme an Ringversuchen und/oder internen (Qualitäts-) Zirkeln, Verwendung von Kontrollen etc.

3.1.14. Umwelt- und Sicherheitsmaßnahmen

Angabe von Sicherheitsmaßnahmen (z. B. Trennung von Prä- und Post-PCR-Bereich), Auflistung der entsprechenden Sicherheitsdatenblätter, Raumtemperatur, Lagerbedingungen

3.1.15. Mögliche Risiken

Angaben zum Arbeitsschutz mit ggf. Verweis auf entsprechende Betriebsanweisungen und auf das Gefahrstoffverzeichnis, ggf. Verweis auf Risikomanagement

3.2. Materialien

3.2.1. Metrologische Rückführbarkeit

Definition Rückführbarkeit und Messunsicherheit:

„Eigenschaft eines Messergebnisses, durch die das Ergebnis mittels einer dokumentierten ununterbrochenen Kette von Kalibrationsschritten mit einer Bezugsgröße (Referenz) in Beziehung gesetzt wird, wobei jeder Schritt in der Kette zur Messunsicherheit beiträgt“ (ISO/IEC Guide 99:2007 International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms).

Die metrologische Rückführbarkeit spielt bei der Konformitätsbewertung eine zentrale Rolle. Mithilfe der metrologischen Rückführbarkeit stellen Labore die Richtigkeit der gemessenen Ergebnisse fest und definieren die Messunsicherheit des verwendeten Produktes.

Beispiele, bei denen die metrologische Rückführbarkeit eine Rolle spielt, sind

- Kalibrierung von Pipetten,
- Eichung von Waagen.

3.2.2. Reagenzien

Angabe der Reagenzien, die für den Validierungsprozess benötigt werden – inklusive Hersteller, Chargenzugehörigkeit (Lotnummer) und Mindesthaltbarkeitsdatum (MHD).

3.2.3. Geräte

Angabe der Geräte, die für den Validierungsprozess benötigt werden – inklusive Seriennummer, Inventarnummer und Hersteller

3.2.4. Software

Angabe der verwendeten Software, die für den Validierungsprozess eingesetzt wurde (Gerätesoftware, Software von Auswertetools etc.) – inklusive Versionsnummer

3.2.5. Referenzmaterial/-kollektiv

Das Referenzkollektiv sollte möglichst divers sein (verschiedene für das Nachweisverfahren relevante Entitäten oder Erreger, Deletionen, Insertionen, Punktmutationen und CNV/Amplifikationen bei Mutationsanalysen, Proben mit verschiedenen Allelfraktionen, verschiedenes Ausgangsmaterial entsprechend Zweckbestimmung (FFPE, gDNA), wenn vorhanden: kommerzielles Referenzmaterial, eventuell Ringversuchsproben bzw. Proben aus Partnerlaboren).

Für die unterschiedlichen Methoden müssen unterschiedliche Referenzkollektive definiert werden, sowohl im Hinblick auf die Probenanzahl als auch auf die Probenmatrix. Das Testkollektiv sollte eine angemessene Größe haben und richtet sich nach dem zu validierenden Verfahren (nicht nach dem Analyten). CE-IVD-Assays benötigen für die Verifizierung eine kleinere Anzahl von Testproben, während IH-IVD eine umfangreiche Validierung mit einem größeren Probenkollektiv erfordern. Hier sollte das Testkollektiv entsprechend umfangreicher sein. Weitere Erläuterungen zum Referenzmaterial/-kollektiv können dem Anhang I entnommen werden.

3.2.6. Kontrollen

Angabe über die verwendeten Kontrollen, die aus plattformagnostischem Material bestehen sollten (also unabhängig von den spezifischen Anforderungen der zu validierenden Plattform sein), oder, wenn nicht möglich, zumindest zugeschnitten auf die am häufigsten angewendeten Methoden sein sollten.

Bei kommerziell erhältlichen Kontrollen muss ein Verweis auf den Hersteller und die Artikelnummer dokumentiert werden und ggf. die verfügbaren Produktspezifikationen. Bei selbst hergestellten Kontrollen muss der Verweis auf die Etablierungs- und Validierungsprotokolle dokumentiert werden².

3.3. Validierungsergebnisse und Leistungsbewertung

3.3.1. Sensitivität

Die Sensitivität ist ein Maß für die Rate richtig positiver Ergebnisse; sie ist bestimmbar durch bekannt positive Fälle. Die Sensitivität muss nur bei IH-IVD und RUO bestimmt werden. Bei CE-IVD-Kits erfolgt die Bewertung der Sensitivität von Herstellerseite. Die Sensitivität berechnet sich anhand folgender Formel:

$$\text{Sensitivität (\%)} = \frac{TP}{(TP + FN)} \times 100$$

3.3.2. Spezifität

Die Spezifität ist ein Maß für die Rate richtig negativer Ergebnisse; sie ist bestimmbar durch bekannt negative Fälle. Die Spezifität muss nur bei IH-IVD und RUO bestimmt werden. Bei CE-IVD-Kits erfolgt die Bewertung der Spezifität von Herstellerseite. Die Spezifität errechnet sich anhand folgender Formel:

$$\text{Spezifität (\%)} = \frac{TN}{(TN + FP)} \times 100$$

3.3.3. Richtigkeit

Die Richtigkeit stellt ein Maß für die Abweichung des Messwertes bzw. des Mittelwertes mehrerer Messwerte vom richtigen (wahren) Wert aufgrund eines systematischen Fehlers dar (95%-Konfidenzintervall). Die Richtigkeit eines Verfahrens kann durch Vergleich der Ergebnisse mit den Ergebnissen eines validierten Alternativverfahrens oder mit den Ergebnissen eines möglichst validierten Referenzkollektivs ermittelt werden. Die Bestimmung der Richtigkeit muss bei jeder Validierung – unabhängig ob es sich um ein CE-IVD-, ein RUO- oder einen Inhouse-IVD-Test handelt, erfolgen. Die Richtigkeit errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Richtigkeit (\%)} = \frac{(TP + TN)}{(TP + FP + FN + TN)} \times 100$$

3.3.4. Präzision

Man unterscheidet Intra- und Inter-Assay-Präzision. Die Bestimmung der Präzision muss bei jeder Validierung erfolgen – unabhängig, ob es sich um ein CE-IVD-, ein RUO- oder einen IH-IVD-Test handelt. Die Präzision deckt die Robustheit mit ab.

Die Intra-Assay-Präzision ist definiert als die Übereinstimmung der Messergebnisse von Parallelbestimmungen der Testprobe(n) innerhalb eines Reaktionsansatzes (→Wiederholbarkeit der Ergebnisse unter identischen Reaktionsbedingungen).

Die Inter-Assay-Präzision ist definiert als die Übereinstimmung der Messergebnisse zwischen wiederholten Bestimmungen der Testprobe(n) in verschiedenen Reaktionsansätzen (→Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in verschiedenen Versuchsansätzen unter gleichen Vergleichsbedingungen).

Sowohl für die Intra- als auch die Inter-Assay-Präzision müssen mindestens zwei Kollektivproben (möglichst eine positive und eine negative Probe) verwendet werden, die für die Bestimmung der Intra-Assay-Präzision jeweils in Dreifachbestimmung prozessiert werden bzw. die für die Bestimmung der Inter-Assay-Präzision an mindestens zwei weiteren Versuchstagen unter Vergleichsbedingungen prozessiert werden sollten.

3.3.5. Nachweisgrenze – Limit of Detection (LOD)

Das LOD ist der niedrigste Anteil an Zielstrukturen in einer Probe oder z. B. die niedrigste Allelfraktion zur sicheren Detektion. Verlässliche Detektion (in 95 % der Replikate) eines Variantentyps (SNV oder Indel).

Typisch verwendete Fallzahl: $n = 3$ mit mindestens vier Verdünnungsstufen.

Das LOD muss bei CE-IVD nicht bestimmt werden. Die Bestimmung des LOD hat hier der Hersteller bereits übernommen.

3.3.6. Erfassungsgrenze – Limit of Blank (LOB) (optional)

Das LOB ist die optionale Berechnung der Detektionsschwelle, also der Spezifität, mit der falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen werden können. Beispielsweise können beim NGS Patienten- oder Normalgewebeproben sequenziert werden, die frei von genetischen Alterationen sein sollten. In der Erregerdiagnostik sind das Proben, bei denen der zu untersuchende Erregertyp nicht nachzuweisen sein sollte. Typisch verwendete Fallzahl: $n = 3-5$.

3.3.7. Definition der Testgrenzwerte (Cut-off)

Hier werden ggf. die zusätzlichen Testgrenzwerte definiert, wie z. B. die maximale Menge an DNA (ng), die in dem Testverfahren eingesetzt werden kann, die innerhalb der Validierung bestimmt werden.

3.3.8. Leistungsbewertung

Die Leistungsbewertung kann die folgenden Punkte umfassen: wissenschaftliche Validität, wissenschaftlich begründete Erwartungswerte, Stand der Wissenschaft (besonders wichtig bei kleinen Referenzkollektiven und geringen Häufigkeiten), Verweis auf Literatur, ggf. Verweis auf bereits existierende Dokumente.

3.3.9. Besonderheiten

Besonderheiten im Validierungsprozess, Hinweise, Probleme, Troubleshooting

3.4. Zusammenfassende Dokumente

3.4.1. Mitgeltende Unterlagen

Auflistung von Handbüchern, Manuals, Gerätebüchern, Verfahrensanweisungen, Arbeitsanweisungen, Formblättern, Informationen, Genlisten etc., jeweils mit aktueller Versionsnummer

3.4.2. Archivierung

Wo erfolgt die Speicherung der Daten? SharePoint, Projektlaufwerke etc. Archivierung entsprechend gemäß aktuell geltenden Qualitätsmanagementvorgaben, Verweis ist ausreichend.

3.4.3. Freigabe (inkl. Zusammenfassung)

Prüfung und Freigabe des Validierungsprojektes durch verantwortliche Person (z. B. QMB, Institutsleitung/Laborleitung) inkl. Datum, Unterschrift. Im Idealfall sollte die Erstellung, Prüfung und Freigabe durch drei unterschiedliche Personen erfolgen. Wenn dies nicht möglich ist, sollte zumindest die Freigabe unabhängig von der Erstellung und Prüfung sein. Die Freigabe sollte durch die Leitung erfolgen. Erstellung:

Prüfung:

Freigabe:

3.4.4. Literaturangabe

3.4.5. Anhang

Bilder, Grafiken, Tabellen, Herstellerangaben etc. (fakultativ)

4. Danksagung

Wir danken für die fachliche Unterstützung durch die Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie (QuIP GmbH), den Berufsverband Deutscher Pathologinnen und Pathologen e. V. (BDP) und die Deutsche Gesellschaft für Pathologie e. V. (DGP).

5. Referenzen

- 1. Rabenau, H. F. et al.** Die neue In-vitro-Diagnostika-Verordnung (IVDR): Hilfestellung bei der Validierung/Verifizierung von im diagnostischen Laboratorium eingesetzten bzw. entwickelten und angewendeten Methoden zum Nachweis von Infektionserregern. GMS Zeitschrift zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien 13, (2022).
- 2. Ihle, M. A. et al.** Handreichung für die Verwendung von Kontrollmaterial in der Molekularpathologie. Deutsche Gesellschaft für Pathologie e.V.; Berufsverband Deutscher Pathologinnen und Pathologen e.V. (2023).
- 3. Geeurickx, E. & Hendrix, A.** Targets, pitfalls and reference materials for liquid biopsy tests in cancer diagnostics. Mol Aspects Med 72, 100828 (2020).
- 4. Jennings, L. J. et al.** Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels. The Journal of Molecular Diagnostics 19, 341-365 (2017).
- 5. Hutchins, R. J., Phan, K. L., Saboor, A., Miller, J. D. & Muehlenbachs, A.** Practical Guidance to Implementing Quality Management Systems in Public Health Laboratories Performing Next-Generation Sequencing: Personnel, Equipment, and Process Management (Phase 1). J Clin Microbiol 57, e00261-19 (2019).
- 6. Ewalt, M. D. & Hsiao, S. J.** Molecular Methods: Clinical Utilization and Designing a Test Menu. Clin Lab Med 44, 123-135 (2024).
- 7. Baretton, G. et al.** HER2-Testung beim Magenkarzinom: Ergebnisse eines deutschen Expertentreffens. Pathologie 37, 361-366 (2016).
- 8. AWMF online.** Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms (2021).
- 9. Overbeck, T. R. et al.** Top-level MET gene copy number gain defines a subtype of poorly differentiated pulmonary adenocarcinomas with poor prognosis. Transl Lung Cancer Res 9, 603-616 (2020).
- 10. Gambella, A. et al.** FISH Diagnostic Assessment of MDM2 Amplification in Liposarcoma: Potential Pitfalls and Troubleshooting Recommendations. IJMS 24, 1342 (2023).
- 11. Bettstetter, M. et al.** MethyQESD, a robust and fast method for quantitative methylation analyses in HNPCC diagnostics using formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples. Lab Invest 88, 1367-1375 (2008).
- 12. AWMF Leitlinienregister.** <https://register.awmf.org/de/start>
- 13. Desmeules, P. et al.** Performance of an RNA-Based Next-Generation Sequencing Assay for Combined Detection of Clinically Actionable Fusions and Hotspot Mutations in NSCLC. JTO Clin Res Rep 3, 100276 (2022).
- 14. Bohaumilitzky, L. et al.** The Different Immune Profiles of Normal Colonic Mucosa in Cancer-Free Lynch Syndrome Carriers and Lynch Syndrome Colorectal Cancer Patients. Gastroenterology 162, 907-919.e10 (2022).
- 15. Budczies, J. et al.** Quantifying potential confounders of panel-based tumor mutational burden (TMB) measurement. Lung Cancer 142, 114-119 (2020).
- 16. Rempel, E. et al.** Pan-cancer analysis of genomic scar patterns caused by homologous repair deficiency (HRD). NPJ Precis Oncol 6, 36 (2022).
- 17. Clark, A. J. & Lillard, J. W.** A Comprehensive Review of Bioinformatics Tools for Genomic Biomarker Discovery Driving Precision Oncology. Genes (Basel) 15, 1036 (2024).

6. Abkürzungen

ABL: Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1	HNPCC: nicht polyposisassoziertes kolorektales Karzinom
AF: Allelfraktion („allelic fraction“)	HPV: humanes Papillomavirus
ALK: analplastische Lymphomkinase	HRD: homologe Rekombinationsdefizienz
BCR: Breakpoint Cluster Region	IGH: Immunglobulinschwerketten-Locus („Immunoglobulin-Heavy-chain-locus“)
BED: Browser Extensible Data	IGK: Immunoglobulin Kappa Locus
BRAF: B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase	IVD: In-vitro-Diagnostika
CE-IVD: CE-In-vitro-Diagnostikum	IHC: Immunhistochemie
CE: Europäische Konformität („Conformité Européenne“)	IH-IVD: Inhouse-in-vitro-Diagnostika
cfDNA: zellfreie Desoxyribonukleinsäure („cell free DNA“)	IVDR: Verordnung über In-vitro-Diagnostika („In-vitro Diagnostic Regulation“)
CI: Konfidenzintervall	KRAS: Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog
CISH: chromogene In-situ-Hybridisierung	LOB: Limit of Blank
CMV: Cytomegalievirus	LOD: Limit of Detection
CNV: Genkopienveränderung („copy number variation“)	LOH: Loss of Heterozygotie
Ct: Schwellenwertzyklus („Cycle Threshold“)	LST: Large-Scale state Transitions
DNA: Desoxyribonukleinsäure („Deoxyribonucleic Acid“)	MDM2: Mouse Double Minute 2 homolog
DraI: Deinococcus radiophilus Enzym	MET: MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
EBV: Epstein-Barr-Virus	MethyQESD: methylation-quantification of endonuclease-resistant DNA
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor	MHD: Mindesthaltbarkeitsdatum
EML4: Echinoderm Microtubule-Associated Protein-like 4	MLH1: MutL Homolog 1
ERBB2: Erb-b2 Receptor tyrosine kinase 2	MMR: Mismatch-Reparatursystem
FFPE: formalinfixiertes, paraffineingebettetes Gewebe	MMRd: MMR-Defizienz
FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	MSH2: MutS Homolog 2
FN: falsch negativ. Anzahl der negativ getesteten Proben im Validierungskollektiv, die nicht konkordant mit der Referenz sind	MSH6: MutS Homolog 6
FOXO1: Forkhead-Box-Protein O1	MSI-H: hohe Mikrosatelliteninstabilität
FP: falsch positiv. Anzahl der positiv getesteten Proben im Validierungskollektiv, die nicht konkordant mit der Referenz sind, sondern Mutationen oder Erreger aufweisen	MSI-L: geringe Mikrosatelliteninstabilität
gDNA: genomische Desoxyribonukleinsäure	MSI: Mikrosatelliteninstabilität
HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2	MSS: Mikrosatellitenstabilität
HEV: Hepatitis-E-Virus	Neg.: negativ
Hg: Human genome	NGS: Next Generation Sequencing
Hin6I: Haemophilus influenza 6I	

NPA: Negative Percentage Agreement

NPV: negativer prädiktiver Wert

NRAS: Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog

NSCLC: nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
(„Non-Small Cell Lung Cancer“)

NTC: No-Template Control

NTRK1: Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1

NTRK2: Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 2

NTRK3: Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 3

PCR: Polymerasekettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“)

PMS2: PostMeiotic Segregation Increased 2

Pos.: positiv

PPA: Positive Percentage Agreement

PPV: positiver prädiktiver Wert

QMB: Qualitätsmanagementbeauftragte

qPCR: quantitative PCR

RNA: Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)

RUO: Research Use Only

SNV: Single Nucleotide Variation

SOP: Standard Operating Procedure

TAI: Telomeric Allelic Imbalance

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TCRB: T-cell receptor beta

TCRG: T-cell receptor gamma

TMB: Tumor Mutational Burden

TN: True Negatives. Anzahl der richtig negativ getesteten Proben (keine Mutation, kein Erregernachweis), die konkordant mit der Referenz sind

TP: True Positives. Anzahl der richtig positiv detektierten Mutationen oder Erreger, die konkordant mit der Referenz sind

TZG: Tumorzellgehalt

versch.: verschieden

VH-JH: variable region and joining element of an immunoglobulin heavy chain

WES: Whole Exome sequencing

WHO: World Health Organization

Xbal: Xanthomonas badrii enzyme

7. Anhang

Die im Folgenden aufgeführten Anhänge sind das Ergebnis eines gemeinsamen Arbeitsprozesses verschiedener Autor*innen. Daher kann es zu Redundanzen und sprachlichen Unterschieden kommen. Die Anlagen vereinen unterschiedliche Perspektiven und fachliche Expertisen.

I. Anhang: Referenzmaterial für die Validierung verschiedener Untersuchungsmethoden

• Definition Referenzmaterial

Ein Referenzmaterial ist laut Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung definiert als ein Material oder eine Substanz von ausreichender Homogenität, bei dem oder der ein oder mehrere Merkmalswerte so genau festgelegt sind, dass das Referenzmaterial zur Kalibrierung von Messgeräten, zur Beurteilung von Messverfahren oder zur Zuweisung von Stoffwerten verwendet werden kann. Referenzmaterialien sind unverzichtbar, wenn es darum geht, die Richtigkeit und Zuverlässigkeit von Messergebnissen zu gewährleisten.

Für die Auswahl des Referenzmaterials können Faktoren wie Stichprobenmenge, schwierige Fälle oder die Nachweisgrenze herangezogen werden. Dazu können Informationen von den Herstellern, Daten vergleichbarer Assays und Literatur dienen.

Ein Probenkollektiv für die Validierung einer Mutationsanalytik muss nicht alle möglichen Varianten abdecken, aber zumindest die klinisch relevanten Aberrationen.

• Kommerzielles/Artifizielles Referenzmaterial (z. B. SensID, Seracare, Horizon etc.)

Die Verwendung von kommerziellem oder artifiziellem Referenzmaterial ist möglich und sollte IVDR-konform hergestellt werden (z. B. Stabilitätstestung, Stichprobenanalyse etc.). Aufgrund der Validierung und Verwendung einer Produktionscharge durch die molekularpathologischen Labore eines Netzwerkes ist ein CE-IVD-Label für das Referenzmaterial nicht zwingend nötig, da entsprechende Vergleichsdaten zu anderen Laboren und Methoden verfügbar sind.

Wenn möglich sollte das Referenzmaterial alle für den Validierungsprozess notwendigen Erreger/Aberrationen abdecken, für den die Nachweise im Labor validiert werden sollen. Aufgrund der spezifischen Primer/Sonden, die die Grundlage für den Nachweis sein können, ist eine Über-

tragbarkeit der Validierungsergebnisse auf andere Subtypen oder Aberrationen nur bedingt möglich oder muss entsprechend durch Begründungen belegt werden (falls keine andere Möglichkeit vorhanden ist). Dabei können aber unterschiedliche Referenzmaterialien für jeden Assay genutzt werden. Falls mit einer Methode mehrere Erreger/Mutationen/Fusionen zusammengefasst nachgewiesen werden, z. B. für nicht tuberkulöse Mykobakterien oder MET Exon 14 Skipping Mutationen, sind repräsentative Vertreter ausreichend. So sollten einige wenige Mutationen in MET repräsentativ für die Validierung eines Assays zur Mutationsbestimmung in MET ausreichend sein. Grundsätzlich sollten die im Referenzmaterial enthaltenen Alterationen mit dem Detektionsspektrum des zu validierenden Assays übereinstimmen. Ein Amplikon-basierter Ansatz kann nur die vom Hersteller vorgegebenen Genfusionen (z. B. EML4::ALK) erfassen, während ein Hybrid-Capture- oder Anchored-Multiplex-PCR-Ansatz alle von einem Gen ausgehenden Fusionen erfasst (z. B. alle ALK-Fusionen auch mit bislang nicht beschriebenen Fusionspartnern). Wie auch bei den Mutationen können hier einige wenige Genfusionen repräsentativ für alle Genfusionen eines Gens gewertet werden. Gegebenenfalls können nicht alle Erreger/Mutationen/Fusionen abgedeckt werden, und mehrere Proben müssen hergestellt werden, um Kreuzreaktivitäten bei den Erregern zu vermeiden oder eine differenzierte Analyse bei den Mutationen/Fusionen zu ermöglichen.

• Anforderungen an die Referenzmaterialien in der Etablierung/Validierung

Das Referenzmaterial sollte in der Zusammensetzung dem Probenmaterial entsprechen, das in der Analytik zum Einsatz kommt (FFPE, Liquid Biopsy etc.) und die entsprechenden Schritte des Produktes bzw. der Produktgruppe abdecken. Mithilfe des Referenzmaterials können die Untersuchungsparameter Sensitivität, Nachweisgrenze, LOD, analytische Spezifität (ausreichend „negative“ Proben zur Bestimmung der Artefakte), Richtigkeit und Genauigkeit (Intra- und Inter-Assay-Reproduzierbarkeit) bestimmt werden. Dafür müssen die Referenzmaterialien entsprechende Spezifikationen aufweisen:

- Definierte und validierte Probenzusammensetzung: enthaltene Mutationen/Fusionen/Erreger mit der zugehörigen Allelfraction bzw. dem Anteil.
- Für die Auswahl des Referenzmaterials können Parameter wie Stichprobenmenge, schwierige Fälle oder Nachweis-

- grenze herangezogen werden. Dazu können Herstellerangaben, Daten vergleichbarer Assays und Literatur dienen.
- Das Probenkollektiv muss nicht alle möglichen Varianten abdecken, aber die Qualitätsparameter sollten für alle Lokalisationen überprüft werden z. B. *EGFR* Exon 18, Exon 19, Exon 20, Exon 21, wobei unterschiedliche Mutationstypen berücksichtigt werden müssen (Insertionen, Duplikationen, Deletionen, Punktmutationen).
 - Wünschenswert sind verschiedene Proben mit unterschiedlichen Allelfractionen (geringe und aufsteigende Allelfractionen, nachweisbare Fusionskopien oder Genkopienveränderungen für Amplifikationsnachweis).
 - Die Nutzung von Referenzproben, die nicht die gesamte Produktgruppe abbilden, könnten für seltene Varianten/ Erreger bedingt genutzt werden. Ein Beispiel hierfür wäre, wenn die Produktgruppe die Präanalytik inkludiert, das Referenzmaterial aber als extrahierte Nukleinsäure vorliegt und für die Validierung verwendet wird.

• „Schwierige“ Varianten/Nachweisgrenzen

Die Definition einer schwierigen Probe ist abhängig von der Fragestellung und muss für die oben aufgeführten Untersuchungsmethoden separat festgelegt werden. Die IVDR schreibt die Bearbeitung schwieriger Proben nicht konkret vor, es sollten aber je nach Untersuchungsparameter und Verfügbarkeit repräsentative Proben im Validierungskollektiv enthalten sein, die realen Diagnostikproben entsprechen. Schwierige Proben können z. B. stark hämolytische Plasmaproben, stark fragmentierte Nukleinsäuren, gering konzentrierte Nukleinsäureextrakte, Varianten mit geringer Allelfraction, seltene Subtypen, Erreger mit hoher Homologie zu anderen Subtypen, komplexe Insertionen/Deletionen oder seltenere Fusionen sein. Schwierige Proben im Rahmen der Validierung sollten so gewählt werden (z. B. Proben knapp über dem LOD), dass diese Vorgaben in der Regel noch erfüllbar sind, da sich Maßnahmen bzw. Konsequenzen daraus ergeben. Repräsentative Proben mit extremeren Eigenschaften/Problemen können auch zusätzlich zum Validierungskollektiv gewählt werden und sollten entsprechend im Voraus charakterisiert und die daraus resultierenden Konsequenzen in der Dokumentation berücksichtigt werden.

Die Nachweisgrenze, die das Referenzmaterial erfassen kann, muss ebenfalls für jede Untersuchungsmethode separat festgelegt werden. Zunächst kann man sich hier an den Herstellerangaben orientieren (technische Nachweisgren-

ze). Eine Begründung kann sich hier auch auf Literaturangaben zum biologischen Vorkommen (z. B. Tumorzellgehalt/ Allelfractionen) stützen. Alternativ können auch eigene Erfahrungswerte herangezogen werden (z. B. technisch bedingte Nachweisgrenzen, wie Hintergrundrauschen bis 5 % AF im NGS). Dieses Vorgehen ist aber zeitlich sehr aufwendig und trägt das Risiko, dass durch einen Bias im Untersuchungsgut falsche Kriterien definiert werden.

• Materialien für die Validierung von molekularpathologischen Verfahren

Grundsätzlich können zwei verschiedene Arten von Materialien als Referenzmaterial für die Validierungsverfahren genutzt werden: synthetisches Material und Patientenproben². Bei der Beschaffung von artifiziellem Material ist eine hohe Ähnlichkeit zu dem später im IVD verwendeten Material (z. B. kurze Fragmente bei FFPE oder Liquid Biopsy) notwendig, um Rückschlüsse auf das Verhalten des IVD in der Routine ziehen zu können. Artifizielle Mutations- und Fusionsproben von verschiedener Beschaffenheit – vom FFPE-fixierten Zellblock bis zu bereits extrahierter DNA und RNA – können dabei mit einer Vielzahl extern validierter genetischer Alterationen kommerziell erworben werden. Auch für Liquid Biopsy gibt es kommerziell erhältliche künstliche Plasmaproben zur Validierung kombinierter Extraktionsmethoden und einen Mutationsnachweis bzw. eine artifizielle cfDNA mit definierten Alterationen für regelmäßige Qualitätskontrollen bei der Sequenzierung³. Patientenmaterial hingegen hat den Vorteil, dass die Qualität der Proben unterschiedlich ist und die Realsituation besser abgebildet werden kann. Allerdings sind extern validierte Patientenproben üblicherweise nur in (kommerziellen) Ringversuchen erhältlich und decken meist nur einen Bruchteil der eigenen Fokusbereiche ab. Die Herstellung von Kontrollmaterial wurde in der Handreichung für die Verwendung von Kontrollmaterial in der Molekularpathologie (Stand Oktober 2023) ausführlich beschrieben². Die Verwendung von Material einer bestimmten Herkunft ist nicht notwendig, außer wenn Vorerfahrungen ein abweichendes Verhalten des Materials vermuten lassen: Zum Beispiel sind Nukleinsäuren aus entkalktem Knochengewebe in FFPE-Gewebe oft von minderer Qualität und Quantität, weswegen bei der Fusionsbestimmung mit RNA-basiertem NGS auch solches Material ausgetestet werden sollte. Insgesamt sind vorgetestete Patientenproben der Goldstandard bei der Validierung von IVD.

Table 2:

Beispielhafte Berechnung der Probenanzahl zur Validierung von NGS-Panels bei der Prüfung von Richtigkeit (Sensitivität, Spezifität), Inter-Assay-Konkordanz, Präzision und Nachweisgrenze (LOD)

	Anzahl	Verdünnung	Tage	Mitarbeiter*in	Genutzt für
Synthetischer Standard	3	1 : 1	A, B, C	A, B, C	Richtigkeit, Reproduzierbarkeit, LOD
Synthetischer Standard	3	1 : 5	A, B, C	A, B, C	Reproduzierbarkeit, LOD
Synthetischer Standard	3	1 : 10	A, B, C	A, B, C	Reproduzierbarkeit, LOD
Synthetischer Standard	3	1 : 20		A	LOD
Patientenproben	20	1 : 1		A	Inter-Assay-Konkordanz, Sensitivität, Spezifität
Gesamtzahl Proben	23				

II. Anhang: Berechnung der Probenanzahl für die Validierung einer neuen Methode

Die wichtigste Frage für die Etablierung einer neuen Methode ist die Definition der Ground Truth (Sollwerte). Hier gibt es zwei verschiedene Ansätze:

1. Einsatz eines extern getesteten Kollektivs z. B. kommerziell verfügbares Referenzmaterial
2. Einsatz eines intern getesteten Kollektivs mit zwei unabhängigen Methoden

Beide Ansätze sind in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der Proben und der Methoden möglich. Die Analysen müssen nicht unabhängig voneinander sein. So können die unverdünnten Proben für die Bestimmung der Sensitivität auch für die Berechnung der Konkordanz mit synthetischen Referenzmaterialien genutzt werden. Wenn das Referenzmaterial an verschiedenen Tagen von verschiedenen Labormitarbeiter*innen bearbeitet wird, kann es zusätzlich für die Berechnung der Reproduzierbarkeit genutzt werden. Je nach Anforderung müssen eventuell mehrere Referenzmaterialien verwendet werden^{4,5}. Hierbei sind die Anzahl bekannter genomischer Positionen im Referenzmaterial, die Größe des verwendeten NGS-Panels, Subtypen der Erreger oder Tumorentitäten zu berücksichtigen.

Der Aufwand für die Validierung und die Anforderungen an das Kontroll-/Referenzmaterial ist dabei stark vom Analyten und der Fragestellung sowie dem zu validierenden Assay abhängig. Typische Fragestellungen sind hierbei folgende:

- a. Müssen mehrere/alle Exone/Subtypen untersucht werden, oder reicht/reichen ein Exon/-Subtyp/einzelne Exone/einzelne Subtypen?

- b. Gibt es literaturbekannte, klar definierte Mutations-Hotspots in einzelnen Kodons, oder muss das gesamte Exon (evtl. inklusive exonnaher Intronbereiche) abgedeckt werden?
- c. Wie niedrig ist die anvisierte Detektionsschwelle?
- d. Wie hoch ist die Prävalenz der untersuchten Mutationen/Erreger?
- e. Soll die Analyse qualitativ oder quantitativ sein?

Die Punkte a bis e beeinflussen dabei vor allem die Analysekomplexität innerhalb der einzelnen Proben, da oftmals für jedes Exon/jeden Erreger eine separate Analysereaktion durchgeführt werden muss. Bei einem niedrig angestrebten Detektionslimit müssen dementsprechend auch stärkere Verdünnungen untersucht werden.

Der Punkt d hat dagegen einen großen Einfluss auf die Anzahl der Proben, die zur Validierung untersucht werden müssen/können, da Patientenmaterial mit äußerst seltenen Alterationen/Erregern (z. B. NTRK-Fusionen, Brucella abortus) dementsprechend rar ist. Falls verfügbar, sollte bei Alterationen oder Erregern mit niedriger Prävalenz zusätzlich auf synthetisches Probenmaterial oder auf Proben aus externen Ringversuchen zurückgegriffen werden. Man muss dann hier begründen, warum nur ein kleines Probenkollektiv zur Anwendung kam.

Die im Folgenden aufgeführten Probenanzahlen für eine Validierung sind also ideale Kollektive. In der Realität werden diese Zahlen durch die Verfügbarkeit von z. B. Referenzmaterial oder durch die Relevanz des Erregers beeinflusst, sodass die Zahlen nicht für alle Entitäten/Erreger und Methoden umgesetzt werden können.

III. Anhang: Validierung der Erregerdiagnostik

Die Analyse von Erregern in der Molekularpathologie ist ein fester Bestandteil der Routinediagnostik.

Der Aufwand für die Validierung ist dabei stark von dem analysierten Erreger, dem angewandten Testsystem und der Fragestellung abhängig:

1. Welche Methode soll angewandt werden (PCR, PCR plus Hybridisierung, Real-Time-PCR)?
2. Wie niedrig ist die anvisierte Detektionsschwelle?
3. Wie hoch ist die Prävalenz der untersuchten Erreger?
4. Müssen mehrere/alle Subtypen detektiert und differenziert werden, oder reicht ein Subtyp (HPV 16 und HPV 18 vs. alle Subtypen oder High-Risk- vs. Low-Risk-HPV)?
5. Gibt es literaturbekannte, klar definierte Erregertypen, die analysiert werden müssen, da sie klinisch, diagnostisch oder prognostisch relevant sind (z. B. S3-Leitlinie Prävention des Zervixkarzinoms; Leitlinienprogramm Onkologie | S3-Leitlinie Zervixkarzinom | Version 2.2 | März 2022)?

Bei der Erregerdiagnostik ist zu beachten, dass die Präanalytik essenziell ist. Das Ausgangsmaterial (FFPE vs. Ausstrich- vs. Abstrichmaterial), die Reinheit des Arbeitsplatzes, der Grad der Fragmentierung der Nukleinsäure und die Konzentration der Probe haben einen entscheidenden Einfluss auf die Detektion des nachzuweisenden Erregers und sollten bei der Validierung berücksichtigt werden und bei Bedarf im Befund kommentiert werden (z. B. bei technisch eingeschränkt verwendbarer Nukleinsäure⁶⁾.

Die Definition des Produktes und der enthaltenen Workflowprozesse sind daher besonders wichtig zu bedenken, da die Variabilität des Ausgangsmaterials entsprechend mitberücksichtigt werden muss, falls die Nukleinsäureextraktion nicht als separates Produkt definiert ist.

Die gängigste Methode beim Nachweis von Erregern an FFPE-Material ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ggf. deren Sonderformen (Multiplex, Nested plus elektrophoretische Detektion, PCR plus Sanger-Sequenzierung, Real-Time-PCR, digitale PCR, PCR plus Hybridisierung, aber auch das NGS (Shotgun-NGS)). Im Folgenden wird jedoch nicht auf NGS eingegangen. Für die Wahl der Nachweismethode sollten die Verfügbarkeit, die Nachweisgrenze, die Turnaround-Zeit, das Nachweisspektrum, die Kosten und die Möglichkeit zur Differenzierung der einzelnen Erreger berücksichtigt werden.

Für die korrekte Interpretation eines negativen PCR-Ergebnisses empfiehlt sich die vorherige Quantifizierung und Interpretation der „Reinheit“ der eingesetzten Proben-Nukleinsäure. Weiterhin ist im Fall der Real-Time-PCR, parallel zum spezifischen Erregernachweis, für jede Probe des Testkollektivs eine PCR eines Housekeeping-Gens (z. B. β -Aktin, β -Globin etc.) als Amplifikationskontrolle durchzuführen; falls RNA-Viren bestimmt werden sollen (z. B. HEV), muss folglich RNA aus menschlichem Gewebe extrahiert werden. Zum Nachweis der Integrität der extrahierten menschlichen DNA reicht eine PCR eines humanen Gens aus, um den Grad der Fragmentierung festzustellen oder um zu überprüfen, ob überhaupt DNA isoliert wurde

Tabelle 3:

Beispielhafte Berechnung einer Stichprobenmenge für den Nachweis von humanen Papillomaviren ohne Differenzierung

	Proben	CE-IVD	IH-IVD
Sensitivität	Positiv	-	10
Spezifität	Negativ	-	10
Richtigkeit	Positiv	1(3x)	1(3x)
	Negativ	1(3x)	1(3x)
Reproduzierbarkeit (Inter-Assay-Präzision)	Positiv	1(2x an versch. Tagen)	1(2x an versch. Tagen)
	Negativ	1(2x an versch. Tagen)	1(2x an versch. Tagen)
Gesamtzahl Proben		10	20

(ausgenommen synthetisch hergestellte kommerziell erworbene DNA). Dies sollte im Validierungsprozess unbedingt berücksichtigt werden. Eine entsprechende Dokumentation im Validierungsreport sollte erfolgen.

Bei der Wahl der entsprechenden Nachweismethode und ihrer Validierung sollte vorher klar definiert werden, welche Erregersubtypen für die Validierung von Relevanz sind, das heißt, validiert man ausschließlich klinisch relevante Subtypen oder validiert man alle detektierbaren Typen. Dies ist u. a. entscheidend für die Zusammenstellung des Testkollektivs.

Das Testkollektiv sollte daher möglichst divers sein und Proben verschiedener Herkunft beinhalten (kommerziell erworbenes Referenzmaterial, Inhouse-Kontrollproben, Ringversuchsproben, Proben aus Partnerlaboren). Die Größe des Testkollektivs richtet sich nach verschiedenen Aspekten:

1. Häufigkeit des zu validierenden Erregers:
häufige Erreger (Mykobakterien, HPV):
höhere Probenanzahl
Seltene Erreger (EBV, CMV, Bartonellen, Listerien etc.):
geringere Probenanzahl
2. Art der Nachweismethode:
qualitativ: geringere Probenanzahl
3. Differenzierung:
Differenzierung notwendig: höhere Probenanzahl
Differenzierung nicht notwendig: geringere Probenanzahl

IV. Anhang: Validierung von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und chromogener In-situ-Hybridisierung (CISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) basiert auf der Bindung von fluoreszenzmarkierten Sonden an ausgewählte genomische Bereiche und der anschließenden mikroskopischen Auswertung. Bei der chromogenen In-situ-Hybridisierung (CISH) sind die Sonden mit Farbstoffen markiert, die lichtmikroskopisch ausgewertet werden können. Die Sonden sind dabei je nach Fragestellung unterschiedlich konzipiert, die klassischen Sondensysteme sind hier zusammengefasst:

• Amplifikations-/Deletionssonden

Untersuchung der Amplifikation/Deletion genomischer Bereiche: Eine Sonde bindet den Genbereich von Interesse (z. B. *ERBB2 (HER2)*), eine zweite Sonde mit unterschiedlichem Fluorophor bindet eine Kontrollregion, meistens das entsprechende Centromer. Bei der Analyse wird die Anzahl beider Signale je Zellkern ausgewertet.

• Translokations-/Fusionssonden

Untersuchung auf chromosomale Brüche (break apart)/ Translokationen: Bei Translokationssonden (z. B. *ALK* oder *FOXO1*) binden die mit unterschiedlichen Fluorophoren markierten Sonden genomische Bereiche 5' und 3' potenzieller Bruchpunkte. Bei der Auswertung zeigen sich in wildtypischen Zellen Mischsignale beider Sonden (i. d. R. gelb); liegt eine Translokation vor, zeigen sich einzelne Signale der jeweiligen Sonden (i. d. R. rot/orange und grün). Bei Fusionssonden binden die mit unterschiedlichen Fluorophoren markierten Sonden genomische Bereiche zweier bekannter Fusionspartner, und die Mischsignale sind nur im Fall einer Translokation zu erkennen (z. B. *BCR::ABL*).

Sonden können in Eigenherstellung produziert werden, die meisten klinisch/diagnostisch relevanten Sondensysteme sind allerdings kommerziell erhältlich und zu einem großen Teil CE-markiert. Bei CE-markierten Sonden, die gemäß der Zweckbestimmung und analog der Herstelleranweisungen verwendet werden, reicht eine Verifizierung der Signalstärke und der korrekten Bindung mit ggf. wenigen Kontrollproben. Wenn der CISH/FISH-Assay nur als RUO erhältlich ist, muss die Sensitivität und Spezifität genau wie bei anderen IH-IVD auf klinische Tauglichkeit geprüft werden. Bei kompletten Eigenproduktionen müssen zusätzliche Tests erfolgen, um z. B. die Sondenspezifität und Sichtbarkeit des Farbstoffes auf dem Gewebe zu prüfen (Sondensequenz, welcher Farbstoff, Kopplungssystem und Herstellungs-SOP). Getestet werden sollten grundsätzlich Gewebe, die auch später untersucht werden sollen.

Zur Interpretation der Daten sollte vorab die Definition positiv vs. negativ benannt sein (z. B. Verhältnis Zielsonden- zu Zentromersondensignalen). Dazu kann z. B. bei der Validierung durch die Untersuchung bekannt negativer Präpara-

Tabelle 4:*Beispielhafte Berechnung einer Stichprobenmenge für die Validierung einer MDM2-FISH*

	Proben	CE-IVD	IH-IVD
Sensitivität	Positiv (Liposarkom)	-	10
Spezifität	Negativ (Fettgewebe)	-	10
Richtigkeit	Positiv	1(3x)	1(3x)
	Negativ	1(3x)	1(3x)
Reproduzierbarkeit (Inter-Assay-Präzision)	Positiv	1(2x an versch. Tagen)	1(2x an versch. Tagen)
	Negativ	1(2x an versch. Tagen)	1(2x an versch. Tagen)
Gesamtzahl Proben		10	20

te ein Schwellenwert definiert werden (z. B. Auswertung von 100 Zellen in zehn bis 20 Präparaten; Bestimmung des Schwellenwertes mithilfe des Mittelwertes plus dreifache Standardabweichung). Für einige Sondensysteme liegen Publikationen mit Auswertekriterien vor (z. B. für *ERBB2* (*HER2*)^{7,8}; *MET*⁹ oder für *MDM2*¹⁰), an denen sich orientiert werden kann. Generell werden bei den meisten Auswertungen 30 bis 100 Zellkerne je Präparat ausgewertet.

Die Schwellenwerte für einen positiven Test unterscheiden sich je nach Assay: Für das hier verwendete Beispiel der *MDM2*-Amplifikationssonde sind jeweils zwei *MDM2* und zwei Zentromer 12-Signale der Wildtyp. Bei schwachen Amplifikationen liegen fünf bis neun Genkopien von *MDM2* pro Zentromer 12-Signale vor, ab einem Verhältnis von 10 : 1 spricht man von High-Level-Amplifikation. Wenn die *MDM2*-Sondensignale aufgrund ihrer Menge mikroskopisch nicht mehr auffindbar sind, ist ebenfalls von einer *MDM2*-High-Level-Amplifikation auszugehen. Hier spricht man von einer Clusteramplifikation. Getestet werden sollten in diesem Beispiel Liposarkome (positiv) und Fettgewebe (negativ), da beide Gewebe ähnliche Eigenschaften aufweisen.

Die Testung auf Reproduzierbarkeit ist abhängig davon, ob FISH-Untersuchungen bereits validiert sind und nur um ein neues Sondensystem erweitert werden. Wenn im Labor noch keine FISH-Analysen durchgeführt werden, empfiehlt sich eine Erweiterung der Reproduzierbarkeits-Assays. Bei Veränderungen, die nur selten auftreten, kann ggf. die Anzahl von positiven Proben reduziert werden. Für die Etablierung können validierte Proben von anderen Instituten ebenso genutzt werden wie (kommerzielle) Referenzmaterialien.

V. Anhang: Validierung von Klonalitätsanalysen mittels Fragmentlängenanalyse

Im Anhang V geht es um die Validierung des Nachweises von klonalen und nicht klonalen T- bzw. B-Zellpopulationen mithilfe einer Fragmentlängenanalyse. Bei jeder Methoden- oder Gerätevalidierung muss die Zweckbestimmung der zu validierenden Methode oder des zu validierenden Gerätes eindeutig definiert sein. Ein Beispiel für die Klonalitätsanalyse durch Fragmentlängenanalyse ist folgende:

„Halbautomatische, qualitative Fragmentlängenanalyse mittels Kapillarelektrophorese (Genetic-Analyzer) zum Nachweis (oder Ausschluss) klonaler Gen-Rearrangements (der FR3- bzw. FR2-Region) des Immunglobulinschwerketten-Locus/der leichten Kette des Kappa-Locus/der T-Zell-Rezeptor Beta-Kette/der T-Zell-Rezeptor Gamma-Kette an aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebeproben oder aus Blut oder Knochenmarkausstrichen isolierter humaner DNA durch unterwiesenes Laborpersonal für alle Patientengruppen zur Unterstützung der onkologischen Diagnosestellung und Therapieprädiktion in der Pathologie.“

In der Präanalytik ist zu beachten, dass die DNA-Extraktion und Quantifizierung gemäß den validierten Verfahrensangeweisungen erfolgen sollten, es eine Trennung von Prä- und Post-PCR-Bereich für die Durchführung und Lagerung von Reagenzien (≤ -18 °C) gibt und die PCR auf Eis vorbereitet werden sollte. Die Leistungsmerkmale sind bei den B-Zelllymphomen Rearrangements von IGH (VH-JH) und IGK, bei den T-Zelllymphomen Rearrangements von TCRG und

Tabelle 5:*Beispielhafte Berechnung der Stichprobenmenge für eine Klonalitätsanalyse*

	Proben	CE-IVD	IH-IVD
Sensitivität	Klonal	-	8-10
Spezifität	Nicht Klonal	-	8-10
Richtigkeit	Klonal	1(3x)	1(3x)
	Nicht Klonal	1(3x)	1(3x)
Reproduzierbarkeit (Inter-Assay-Präzision)	Klonal	1(2x an versch. Tagen)	1(2x an versch. Tagen)
	Nicht Klonal	1(2x an versch. Tagen)	1(2x an versch. Tagen)
Gesamtzahl Proben		10	20

TCRB. Bei jeder PCR sollte eine polyklonale Kontrolle mitgeführt werden. Die Befundinterpretation erfolgt anhand der Interpretation/Unterteilung des Musters der nachgewiesenen Fragmente:

- Nicht Klonal: polyklonal, oligoklonal, pseudoklonal
- Klonal: monoallelisch, biallelisch (mit oder ohne polyklonalem Hintergrund)
- Für die Validierung der Klonalitätsanalyse anhand von Fragmentlängenanalysen sollten mindestens acht klonale und acht nicht klonale Referenzproben bzw. Proben aus Partnerlaboren analysiert werden.

VI. Anhang: Validierung der Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ist eine Form der genomischen Instabilität, die durch die Insertion oder Deletion sich wiederholender Basen innerhalb von Mikrosatelliten-Loci während der DNA-Replikation verursacht wird und nicht durch das Mismatch-Reparatursystem (MMR) korrigiert werden kann. Hier liegt eine MMR-Defizienz (MMRd) zugrunde, die immunhistochemisch durch die Überprüfung der folgenden MMR-Proteine MSH2, MSH6, PMS2 und MLH1 detektiert werden kann. Beurteilt wird hier der Verlust der MMR-Proteinexpression. Molekulare Methoden können ergänzend eingesetzt werden, um den MMR/MSI-Status zu beurteilen z. B. die PCR-basierte Fragmentlängenanalyse, auf die sich der folgende Text bezieht.

Das Ziel einer Validierungsstudie ist es, die qualitative Leistung der PCR-basierten Fragmentlängenanalyse an

FFPE-Material oder DNA aus Frischgewebe an bereits charakterisierten Proben zu testen. Hierbei sollten sowohl die verwendeten Instrumente, die Kits und die Software in den Validierungsdokumenten aufgeführt werden. Bei den Leistungsmerkmalen ist zu unterscheiden, ob der Nachweis über Mono- oder Dinukleotid-Repeat-Marker durchgeführt wird und wie viele Marker untersucht werden. Die Mikrosatelliteninstabilität wird durch Auftrennung der PCR-Fragmente durch Kapillarelektrophorese nach der PCR-Amplifikation von DNA aus Tumorgewebsproben und je nach Nachweis auch aus Normalgewebsproben desselben Patienten/derselben Patientin bestimmt. Falls der Nachweis in der Routinediagnostik an Tumor- und Normalgewebe durchgeführt wird, sollten auch in der Etablierungs- und Validierungskohorte Tumor- und Normalgewebe ausreichend vorhanden sein. Wenn der Nachweis später nur an Tumorgewebe erfolgt, ist in der Etablierungs- und Validierungskohorte Normalgewebe nicht zwingend erforderlich. Instabile Loci im Tumorgewebe sind durch zusätzliche Peaks und/oder eine Verschiebung in der Verteilung der Peaks im Vergleich zum normalen Gewebe gekennzeichnet. Auf dieser Grundlage wird jeder einzelne Marker dann als „stabil“ oder „instabil“ eingestuft. Bei der PCR-basierten Fragmentlängenanalyse wird die Tumorgewebsprobe bei kolorektalen Karzinomen im Allgemeinen als mikrosatellitenstabil bewertet, wenn mindestens zwei Marker instabil sind. Alternative Methoden können andere Schwellenwerte aufweisen.

Als Referenzmaterial können CE-IVD-kommerzielle Standards oder auch IH-IVD-Kontrollen herangezogen werden. Das Referenzkollektiv sollte aus DNA-Proben bestehen, die bereits mit der IHC-Methode oder einem anderen PCR-

Tabelle 6:

Beispielhafte Berechnung der Stichprobenmenge für die Validierung eines Mikrosatelliteninstabilitätsnachweises

	Proben	CE-IVD	IH-IVD
Sensitivität	MSI-H	-	8-10
Spezifität	MSS	-	8-10
Richtigkeit	MSI-H	1(3x)	1(3x)
	MSS	1(3x)	1(3x)
Reproduzierbarkeit (Inter-Assay-Präzision)	MSI-H	1(2x an versch. Tagen)	1(2x an versch. Tagen)
	MSS	1(2x an versch. Tagen)	1(2x an versch. Tagen)
Gesamtzahl Proben		10	20

basierten Nachweis analysiert wurden. Die verwendete Fallzahl sollte bei $n = 20$ Tumorproben pro Entität liegen, da es entitätsspezifische Unterschiede in der Auswertung gibt. Die Mindestmenge der einzusetzenden DNA ist abhängig von ihrer Konzentration und den herstellereitigen Angaben. Zu berücksichtigen ist ebenfalls der Tumorzellgehalt der Probe, da die Anforderungen bei unterschiedlichen Entitäten verschieden sein können. Der Tumorgehalt bei kolorektalen Karzinomen sollte $\geq 20\%$ sein, bei anderen Entitäten ist ein höherer Tumorzellgehalt erforderlich, hierbei kann man sich nach Literaturangaben richten. Für alle Tumorentitäten gilt, dass die Anzahl der Kernzellen ausreichend sein sollte, basierend auf der standardmäßigen pathologischen Charakterisierung.

Eine PCR-Reaktionen unter Verwendung von Kontroll-DNA (MSS und MSI) und negativen Kontrollen (keine DNA, Reinstwasser oder Elutionspuffer, NTC (no template control)) sollten gleichzeitig mit den Patientenproben analysiert werden, um die Leistungsfähigkeit des Assays zu überprüfen. Eine NTC sollte mitgeführt werden, um sicherzustellen, dass keine unspezifischen PCR-Amplifikate im Sinne einer Kontamination gebildet wurden. NTC sollten keine amplifizierten Peaks oberhalb der analytischen Schwelle aufweisen. Die positive Kontrollreaktion wird analysiert, um nachzuweisen, dass die Amplifikationschemie wie erwartet funktioniert hat.

VII. Anhang: Validierung der quantitativen *MLH1*-Promotor-Methylierungsanalyse durch Real-Time-qPCR

Das hereditäre nicht polyposisassoziierte kolorektale Karzinom (HNPCC), auch als Lynch-Syndrom bezeichnet, stellt die häufigste erbliche Form des kolorektalen Karzinoms dar. Seine Prävalenz liegt bei etwa 1 : 500. Insgesamt gelten rund 3 bis 5 % aller Kolonkarzinome als erblich bedingt, weshalb die Abgrenzung zu sporadischen Fällen von großer Bedeutung ist. Das Lynch-Syndrom wird durch Mutationen in den MMR-Genen (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* oder *PMS2*) verursacht, die letztendlich zu einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) führen. Eine MSI-H liegt bei etwa 90 % der HNPCC-assoziierten Tumoren vor, während sie bei sporadischen Karzinomen nur in etwa 10 % der Fälle nachweisbar ist. In einem Großteil der sporadischen Fälle beruht der Verlust der *MLH1*-Expression auf einer Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors, häufig kombiniert mit einer *BRAF*-p.Val600Glu-Mutation, wenn auch nicht ausnahmslos. Daher werden *MLH1*-Promotor-Methylierungs- und *BRAF*-p.Val600Glu-Mutationsanalysen in MSI-H kolorektalen Tumoren mit fehlender *MLH1*-Expression empfohlen¹¹.

Eine Möglichkeit, den *MLH1*-Promotor-Methylierungsstatus in FFPE-DNA nachzuweisen, ist der Einsatz von methylierungssensitiven Endonukleasen (z. B. *Hin6I*) mit der MethyQESD- (methylation-quantification of endonuclease-resistant DNA) Methode. Bei vorliegender Promoter-Methylierung kann kein Verdau stattfinden, und eine Amplifikation ist nachweisbar. Bei unmethylierter DNA erfolgt der Abbau, und es ist kein PCR-Produkt des zu untersuchenden Bereiches

Tabelle 7:Beispielhafte Berechnung der Stichprobenmenge zur Validierung von *MLH1*-Promotermethylierungsanalysen

	Proben	CE-IVD	IH-IVD
Sensitivität	Positiv (methyliert)	-	8-10
Spezifität	Negativ (nicht methyliert)	-	8-10
Richtigkeit	Positiv	1(3x)	1(3x)
	Negativ	1(3x)	1(3x)
Reproduzierbarkeit (Inter-Assay-Präzision)	Positiv	1(2x an versch. Tagen)	1(2x an versch. Tagen)
	Negativ	1(2x an versch. Tagen)	1(2x an versch. Tagen)
Gesamtzahl Proben		10	20

detektierbar. Die Detektion erfolgt über eine spezifische quantitative Real-Time-PCR-Amplifikation auf Real-Time-PCR-Geräten, z. B. LightCycler (Roche) oder QuantStudio (Thermo Fisher Scientific), die entsprechend validiert werden müssen.

Es wird eine Makrodissektion aus dem zu untersuchenden Gewebe vor DNA-Extraktion empfohlen, um den Anteil der DNA aus Tumorzellen zu erhöhen. Die Auswertung kann durch Normal- und Stromagewebe erschwert werden. Zum Ausschluss einer Keimbahnmethylierung kann parallel zu jeder Tumor-DNA eine entsprechende Nichttumor-DNA des Patienten getestet werden. Falls der Nachweis in der Routinediagnostik an Tumor- und Normalgewebe durchgeführt wird, sollten auch in der Etablierungs- und Validierungskohorte Tumor- und Normalgewebe ausreichend vorhanden sein. Wenn der Nachweis später nur an Tumorgewebe erfolgt, ist in der Etablierungs- und Validierungskohorte Normalgewebe nicht zwingend erforderlich. Bei Einsatz in der Routinediagnostik sollten bei jeder Untersuchung folgende Laufkontrollen mitgeführt werden:

- Eine DNA, die eine *MLH1*-Promotor-Methylierung aufweist (Positivkontrolle, z. B. Zelllinie SW48),
- ggf. eine unmethylierte DNA (z. B. Blut-DNA) und
- eine Negativkontrolle (keine DNA, Reinstwasser oder Elutionspuffer, NTC).

Das Verfahren umfasst eine Kalibratorreaktion, den Verdau mit Methylierungs-unabhängigen Endonukleasen z. B. *XbaI/DraI* für jede Kontrolle und Probe. Dies dient als Kontrolle von DNA-Verdau und Amplifikation und wird zur Quantifizierung der relativen Methylierung verwendet. Für eine erfolgreiche

Amplifikation sollte der Ct-Wert <32 sein. Jede DNA-Probe sollte in Duplikaten getestet werden.

Die hier beschriebene MethyQESD-Methode mit Validierungsleistungskenndaten wurde von Bettstetter et al. vorgestellt¹¹. Bei einer Validierung ist insbesondere eine Überprüfung der optimalen DNA-Inputmenge (z. B. Verdünnungsreihen zwischen 25 und 500 ng) und -qualität, der Spezifität und Sensitivität der Methode und des Grenzwertes für eine positive Methylierung erforderlich, dafür sollten *MLH1*-Promotor-methylierte und -unmethylierte DNA-Proben verwendet werden. Die verwendete Stichprobenmenge sollte bei n = 20 Tumorproben pro Entität liegen, da es entitäts-spezifische Unterschiede in der Auswertung gibt.

Der Sollwert dieser Proben kann mithilfe von alternativen Verfahren zur Bestimmung der Promotormethylierung (z. B. ausgehend von einer Bisulfitkonvertierung) und basierend auf der Expressionsanalyse (IHC) von *MLH1* sowie dem Nachweis von MSI-H bestimmt werden. Auch hier können kommerziell erhältliche Referenzmaterialien verwendet werden.

VIII. Anhang: Validierung der Einzelgen-mutationsanalyse

Die Analyse von einzelnen Genen in der Molekularpathologie hat nach wie vor ihre Berechtigung zur schnellen und kostengünstigen Bestimmung einzelner/weniger Parameter in bestimmten Indikationen, wie z. B. *BRAF*-Val600-Mutationen bei Schilddrüsenkarzinomen und Melanomen oder *KRAS/NRAS*-Mutationen bei kolorektalen Karzinomen.

Tabelle 8:

Beispielhafte Berechnung der Testzahl zur Validierung von PCR-basierten Assays in der Einzelgenmutationsanalyse

	Proben	CE-IVD	IH-IVD
Sensitivität	Positiv	–	10
Spezifität	Negativ	–	10
Richtigkeit	Positiv	1(3x)	1(3x)
	Negativ	1(3x)	1(3x)
Reproduzierbarkeit (Inter-Assay-Präzision)	Positiv	1(2x an versch. Tagen)	1(2x an versch. Tagen)
	Negativ	1(2x an versch. Tagen)	1(2x an versch. Tagen)
Gesamtzahl Proben		10	20

Der Aufwand für die Validierung und die Anforderungen an das Kontroll-/Referenzmaterial ist dabei stark vom analysierten Gen und der Fragestellung sowie dem zu validierenden Assay abhängig (s. II. Anhang: Berechnung der Probenanzahl für die Validierung einer neuen Methode).

Generell sollte sich die Stichprobenmenge im Bereich von mindestens zehn Proben bewegen. Diese Zahl muss aber in jedem Fall je nach Analyse unter Berücksichtigung der oben genannten Punkte oder weiterer für die jeweilige Analyse oder Fragestellung spezifischer Besonderheiten kritisch hinterfragt werden (z. B.: Habe ich unverhältnismäßig häufig mit qualitativ schlechtem Probenmaterial zu tun? Beispiel: schlecht fixierte Uteri bei Endometriumkarzinomen) und ggf. nach oben korrigiert werden.

Für einige PCR-basierte Nachweisverfahren gibt es CE-IVD-Assays, die aufgrund der Vorgaben der IVDR nicht validiert, aber verifiziert werden müssen. Hierbei können umfangreiche Tests auf Sensitivität und Spezifität entfallen, da Kennwerte vom Hersteller geliefert werden und nur mit wenigen Proben auf Konkordanz geprüft werden müssen. In Tabelle 8 findet sich eine beispielhafte Rechnung für die Anzahl an Proben, die man im Rahmen einer Validierung für die von der IVDR gewünschten Parameter analysieren sollte. Ein Referenzkollektiv für die Mutationsanalyse sollte mehr positive Proben (z. B. pos./neg. 80/20 %) enthalten und die Diversität bei der Untersuchung der Sensitivität berücksichtigt werden. Die Validierung sollte den gesamten Bereich abdecken, in dem Alterationen auftreten können. Hierbei sollten unterschiedliche Formen von Alterationen berücksichtigt werden: Punktmutationen und Insertionen/Deletionen.

IX. Anhang: Validierung von Multigenmutationsanalysen

Weitverbreitet ist in der molekularen Pathologie die Verwendung von Multigenanalysen, bei denen die Mutationsinformationen mehrerer Gene in einer Sequenzierung erfasst werden. Es handelt sich also um eine gemeinsame Testung vieler Einzelmarker. Da hier die einzelnen untersuchten Gene oder Genbereiche analytisch kaum getrennt werden können, sollte eine gemeinsame Validierung durchgeführt werden. Insbesondere die für die jeweilige Entität geforderten Konsensusgene, Genbereiche und Sensitivitäten spielen bei der Validierung eine wichtige Rolle (vgl. z. B. AWMF Leitlinienregister¹²). Beispielsweise sollten bei der Analytik von NSCLC-Mutationen in *EGFR* (Exone 18–21), *BRAF* (Exon 15), *KRAS* und *ERBB2* (Exon 20) mit einer Sensitivität von 5 % Allelfraktion mit einem Konfidenzintervall von 95 % erfasst werden.

Wie unten beispielhaft berechnet, sollten ca. 15 bis 25 Proben für die Validierung eines Multigenpanels verwendet werden. Die Größe des Validierungskollektivs ist hierbei aber stark abhängig von der Panelgröße, dem Umfang der synthetischen Referenz oder auch von den verwendeten Patientenproben. Dabei muss nicht für jedes neue Panel eine vollständige Validierung durchgeführt werden, da die zugrunde liegende Technik (Hybrid-Capture oder Amplikon-basiertes NGS etc.) und nicht die Auswahl der Gene und Genbereiche maßgeblich für die Analyseleistung ist. Es sollte daher eine Verifizierung mit synthetischem Referenzmaterial erfolgen. Falls hier vergleichbare Ergebnisse mit der vorangegangenen Validierung erreicht werden,

Tabelle 9:

Beispielhafte Berechnung der Probenanzahl zur Validierung von NGS-Panels bei der Prüfung von Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität, Präzision und Nachweisgrenze (LOD)

	Anzahl	Verdünnung	Tage	Mitarbeiter*in	Genutzt für
Synthetische Referenz	3	1 : 1	A, B, C	A, B, C	Richtigkeit, Reproduzierbarkeit, Limit of Detection
Synthetische Referenz	3	1 : 5	A, B, C	A, B, C	Richtigkeit, Reproduzierbarkeit, Limit of Detection
Synthetische Referenz	3	1 : 10	A, B, C	A, B, C	Richtigkeit, Reproduzierbarkeit, Limit of Detection
Synthetische Referenz	3	1 : 20		A	Limit of Detection
Patientenproben	20*	1 : 1		A	Inter-Assay-Präzision – Vergleich mit anderen Panels/ Methoden
Gesamtzahl Proben	23				

*Anzahl der Patientenproben stark abhängig von Panelgröße, synthetischer Referenz oder Patientenproben

muss nur die Abdeckung der zusätzlichen Zielgene und Genbereiche geprüft werden.

Bei der Erweiterung des bisherigen Panels um neue Konsensusgene kann eine retrospektive Erfassung der bislang sequenzierten Fälle erfolgen, falls das Gen schon im Panel enthalten war, aber bioinformatisch nicht ausgewertet wurde. Wenn die gefundene Mutationshäufigkeit der in der Literatur publizierten entspricht, ist eine erneute Validierung nicht notwendig. Wenn das Panel neu designt wird und neue Gene zusätzlich umfasst werden, sollten erneut künstliche Referenzmaterialien und Vergleichsproben aus der Routine für eine Untersuchung der Konkordanz genutzt werden. Nur bei starken Methodenänderungen (z. B. Extraktionsmethode, Herstellerwechsel, Sequenziermethode) ist eine komplette Neuvalidierung notwendig.

Die wichtigste Frage für die Etablierung einer neuen NGS-Methode ist die Definition des „Ground Truth“, der Sollwerte. Hier gibt es zwei verschiedene Ansätze:

1. Einsatz eines extern getesteten Kollektivs z. B. kommerziell verfügbares Referenzmaterial
2. Einsatz eines intern getesteten Kollektivs mit zwei unabhängigen Methoden

Beide Ansätze sind möglich, aber abhängig von der Verfügbarkeit von Proben und Methoden. Bei dem zweiten Ansatz zählt der Vergleich von Patientenproben, die mit einer bereits validierten IVD am Standort untersucht wurden. In dieser Analyse werden die genomischen Positionen, die in der Schnittmenge des zu validierenden Panels und des Referenzpanels liegen (Schnittmenge der BED-Files) und von beiden Panels mit einer Coverage von z. B. mindestens 200-fach abgedeckt werden, zur Berechnung genutzt. Hieraus kann das Positive Percentage Agreement (PPA, Sensitivität) und das Negative Percentage Agreement (NPA, Spezifität) mit 95%-Konfidenzintervall auf Basis der Erfahrungswerte berechnet werden:

PPA = $TP / (TP + FN)$, Patientenprobe analysiert mit orthogonalem Assay ist Referenz

NPA = $TN / (TN + FP)$, Patientenprobe analysiert mit orthogonalem Assay ist Referenz

Typisch verwendete Fallzahl: n = 10-20

Die notwendigen Analysen müssen nicht unabhängig voneinander sein; die unverdünnten Proben für die analytische Sensitivität können für die Berechnung der Präzision mit synthetischem Referenzmaterial genutzt werden (Tabelle 9). Wenn die Proben an verschiedenen Tagen von verschiede-

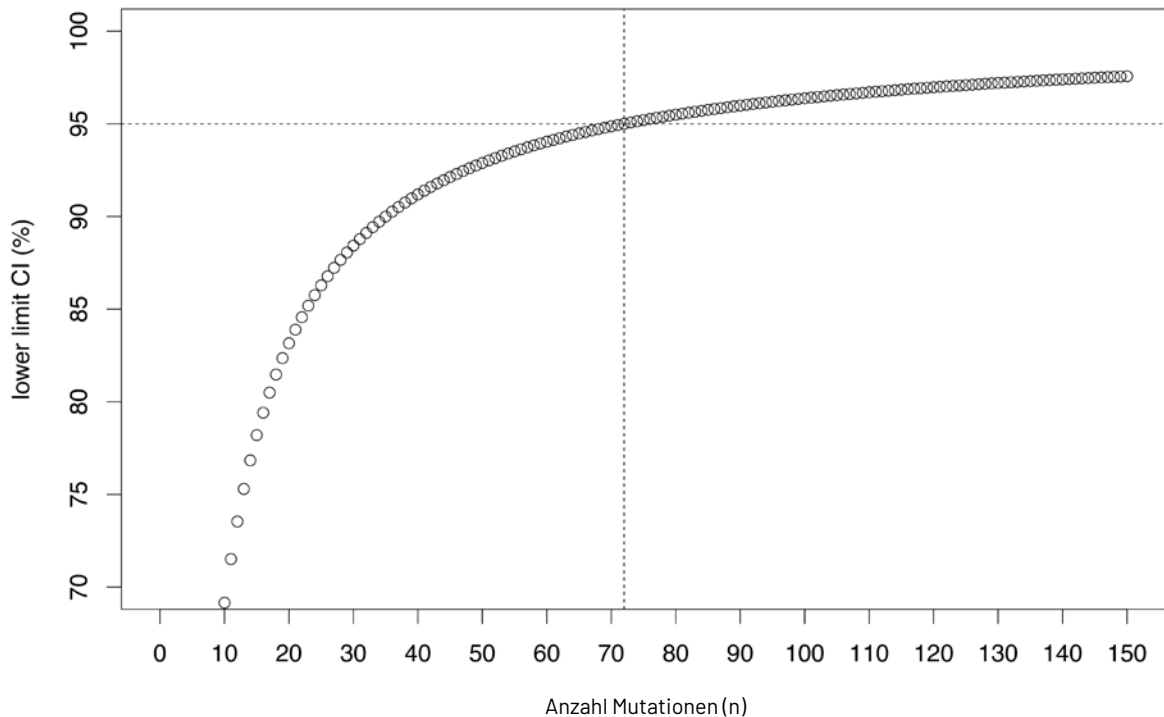


Abbildung 3:

Darstellung der Konfidenzintervalle (lower limit CI) bei einer gegebenen Anzahl Mutationen (n) berechnet durch den Clopper-Pearson-Algorithmus

nen Labormitarbeiter*innen bearbeitet werden, können sie zusätzlich für die Berechnung der Reproduzierbarkeit herangezogen werden. Unter Umständen (Anzahl bekannter genomischer Positionen im Referenzmaterial, Größe des verwendeten NGS-Panels) müssen dafür mehr als drei Proben verwendet werden. Falls eine Erfassungsgrenze (LOB) ebenfalls ermittelt werden soll, sind hier noch drei bis fünf zusätzliche mutationsfreie Proben notwendig.

Bei der Parallelsequenzierung kann bei der Ermittlung der Richtigkeit die Anzahl der mutierten Positionen zur Berechnung genutzt werden, nicht die Anzahl der sequenzierten Proben.

Um die Richtigkeit zu bestimmen, kann u. a. der Clopper-Pearson-Algorithmus verwendet werden. In der Abbildung 3 sind die Berechnungen der Konfidenzintervalle bei zweiseitiger Signifikanz und 100 % Konkordanz abgebildet. Anhand der Abbildung kann man ablesen, dass man bei 95 % mindestens $n = 72$ Mutationen benötigt, deren erwarteter und realer Wert übereinstimmen. Dies gilt ebenfalls für den Anhang X: Validierung von Multigenfunktionsanalysen.

X. Anhang: Validierung von Multigenfusionsanalysen

Die Multigenfusionsanalyse mittels RNA-basiertem NGS nimmt in der Pathologie einen immer höheren Stellenwert ein. In diesem Untersuchungsverfahren können Tumoren in einem Ansatz auf mehrere chromosomale Translokationen analysiert (z. B. *NTRK1*, *NTRK2* und *NTRK3*) und ggf. Aufschluss über den Translokationspartner gegeben werden. Hierbei ist es wichtig, vorab die Leistungsmerkmale zu definieren:

- Angaben über die Gene, die gezielt auf Fusionen analysiert werden (z. B. in Form von Genliste inklusive Referenzsequenz im Appendix).
- Angabe, ob nur bekannte oder auch unbekannte Fusionen und Fusionspartner detektiert werden können (z. B. über einen Imbalance-Score).
- Welches Referenzgenom genutzt wird (z. B. hg19, hg38).
- Welche Häufigkeit der Fusionen man erwartet (vgl. mit der aktuellen Literatur) oder als Richtwert selbst definiert.

Zur Interpretation der Daten sollten vorab Schwellenwerte und Definition positiv vs. negativ benannt sein. Zum Beispiel: Welche Qualitätsmerkmale müssen zur Negativbefundung eines Gens erreicht werden (z. B. minimale Anzahl Reads)? Welche Qualitätsmerkmale müssen vor allem bei Analysen zur Positivbefundung einer Fusion erreicht werden (z. B. mindestens % fusionsbestätigende Reads/ Mindestanzahl fusionsbestätigende Reads)? Welche komplementären Methoden können zur Befundvalidierung verwendet werden (z. B. FISH)? Welche Details werden dokumentiert (z. B. Dokumentation nach netzwerkspezifischen Vorgaben)? Für die Multigenfusionsanalyse mittels RNA-basiertem Next-Generation-Sequencing kann nach erfolgter Validierung die Sensitivität bzw. Spezifität anhand Tabelle 10 berechnet werden. Wie in Tabelle 11 dargestellt, muss dann die erreichte Sensitivität und Spezifität bewertet werden.

Bei der Parallelsequenzierung kann bei der Ermittlung der Richtigkeit die Anzahl der mutierten Positionen zur Berechnung genutzt werden, nicht die Anzahl der sequenzierten Proben.

Um die Richtigkeit zu bestimmen, kann u. a. der Clopper-Pearson-Algorithmus verwendet werden. In der Abbildung 3, Anhang IX, sind die Berechnungen der Konfidenzintervalle bei zweiseitiger Signifikanz und 100 % Konkordanz abgebildet. Anhand der Abbildung kann man ablesen, dass man bei 95 % mindestens $n = 72$ Aberrationen benötigt, deren erwarteter und realer Wert übereinstimmen.

Die Genauigkeit kann man über den Vergleich mit anderen Panels bestimmen. In dieser Analyse werden die genomischen Positionen, die in der Schnittmenge des zu validierenden Panels und des Referenzpanels liegen (Schnittmenge der BED-Files) und von beiden Panels mit einer Coverage von z. B. mindestens 200-fach abgedeckt werden, zur Berechnung genutzt. Hieraus kann das Positive Percentage Agreement (PPA, Sensitivität) und das Negative Percentage Agreement (NPA, Spezifität) mit 95%-Konfidenzintervall auf Basis der Erfahrungswerte berechnet werden:

$PPA = TP / (TP + FN)$, Patientenprobe analysiert mit orthogonalem Assay ist Referenz.

$NPA = TN / (TN + FP)$, Patientenprobe analysiert mit orthogonalem Assay ist Referenz.

Typisch verwendete Fallzahl: $n = 20$

Tabelle 10:

Sensitivität/Spezifität berechnet mit Matrix

		SOLL (entsprechend Erwartungswert)	
		Positiv (z. B. Anzahl bekannter Fusionen) (total positiv = x)	Negativ (z. B. Anzahl Gene bekannt negativ für Fusionen) (total negativ = y)
IST	Positiv	Anzahl richtig positiv	Anzahl falsch positiv
	Negativ	Anzahl falsch negativ	Anzahl richtig negativ

Tabelle 11:

Dokumentation der Bewertung von Sensitivität und Spezifität

	Neues Verfahren (%)	Zielsetzung (%)	Bewertung
Sensitivität	Berechnete Sensitivität	>98*	Erwartungswert erfüllt/nicht erfüllt
Spezifität	Berechnete Spezifität	>98*	Erwartungswert erfüllt/nicht erfüllt

* vgl. u. a. Desmeules et al., 2022¹³

Bei der Präzision unterscheidet man Intra- und Inter-Assay-Präzision. Die Bestimmung der Präzision muss bei jeder Validierung – unabhängig ob es sich um ein CE-IVD-, ein RUO- oder einen IH-IVD-Test handelt – erfolgen. Sowohl für die Intra- als auch die Inter-Assay-Präzision müssen mindestens zwei Kollektivproben (möglichst eine positive und eine negative Probe) verwendet werden, die für die Bestimmung der Intra-Assay-Präzision jeweils in Dreifachbestimmung prozessiert werden bzw. welche für die Bestimmung der Inter-Assay-Präzision an mindestens zwei

weiteren Versuchstagen unter Vergleichsbedingungen prozessiert werden. Die Ergebnisse und die Übereinstimmung mit dem Erwartungswert müssen protokolliert werden (Tabelle 12, 14).

Das Limit of Detection (LOD) ist die niedrigste Allelfraction oder der niedrigste Anteil an Zielstrukturen in einer Probe zur sicheren Detektion: verlässliche Detektion (in 95 % der Replikate) einer Fusion. Typisch verwendete Fallzahl: n = 3 mit mindestens vier Verdünnungsstufen (Tabelle 13).

Tabelle 12:

Präzisionsbestimmung bei der Fusionsanalyse

Proben-Nr.	Anzahl detektierter Fusionen					
	Erwartet	Lauf 1 (Triplikation)			Lauf 2	Lauf 3
Positivkontrolle 1	Anzahl Fusionen in Positivkontrolle 1					
Probe mit bekannter Fusion	1					
Negativkontrolle	0					

Tabelle 13:

Bestimmung des Limit of Detection (LOD)

Proben-Nr.	Anzahl detektierter Fusionen						Sensitivität	Erwartungswert	Bewertung
	Erwartet	Verdünnung 1	Verdünnung 2	Verdünnung 3	Verdünnung 4	Verdünnung 5			
1	1 Fusion						>95 %	Erwartungswert erfüllt/ nicht erfüllt	
2	1 Fusion								
3	1 Fusion								

Tabelle 14:

Beispielhafte Berechnung der Testzahl zur Validierung von Multigenfusionsanalysen

	Proben	CE-IVD	IH-IVD
Sensitivität	Positiv	-	10
Spezifität	Negativ	-	10
Richtigkeit	Positiv	1 (3x)	2-3 (3x)
	Negativ	1 (3x)	2-3 (3x)
Reproduzierbarkeit (Inter-Assay-Präzision)	Positiv	1 (2x an versch. Tagen)	1 (3x an versch. Tagen)
	Negativ	1 (2x an versch. Tagen)	1 (3x an versch. Tagen)
Gesamtzahl Proben		10	26

Der Limit of Blank (LOB) ist die optionale Berechnung der Detektionsschwelle, also der Spezifität, mit der falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen werden können. Beim NGS werden hierfür Patienten- oder Normalgewebeprouben sequenziert, die frei von onkogenen genetischen Alterationen sein sollten. Typisch verwendete Fallzahl: $n = 3-5$.

Darüber hinaus kann die vollständige Validierung einzelner häufigerer Genfusionen gemäß Vorgaben in „New York State Department of Health Guidelines – NGS guidelines for somatic genetic variant detection, revised 2021“ durch Nachweis von mindestens drei positiven Fällen pro Fusion ergänzt werden.

Die Leistungsbewertung kann erfolgen über eine Auswertung wissenschaftlicher Validität (z. B. Auflistung von untersuchten Fusionen inkl. entsprechend typischer Entität, Prävalenz der Fusion in Entität, Relevanz (z. B. Therapeutik/Differenzialdiagnostik) und entsprechender Literaturreferenz), wissenschaftlich begründete Erwartungswerte, Stand der Wissenschaft (z. B. Relevanz der Methode in Tumordiagnostik unter Verweis auf relevante Leitlinien/WHO-Empfehlungen). Sie ist besonders wichtig bei kleinen Referenzkollektiven und geringen Häufigkeiten.

XI. Anhang: Validierung von genomweiten Biomarkern mit quantitativer Komponente

Genomweite Biomarker beinhalten die Analyse mehrerer Gene bis hin zu Gesamtexonen oder -genomen. Bei der Implementierung der Produkte orientiert sich die Pathologie an den zugelassenen Testverfahren und den Entitäten, bei denen der Biomarker nachgewiesen werden soll:

- a. Bei MSI ist dies die Erfassung von veränderten Mikrosatellitenregionen und die Untersuchung der auslösenden deletären Mutationen in *PMS2*, *MLH1*, *MSH2* und *MSH6*¹⁴.

- b. Der TMB kann aufgrund unterschiedlicher Mutationsarten berechnet werden. Üblicherweise erfolgt hier eine Bestimmung aller nicht synonymen Mutationen in Regionen von mehr als 1 Mbp¹⁵.
- c. Zur Berechnung des homologen Rekombinationsdefizienz-(HRD-) Scores werden exomweit chromosomale Zugewinne und Verluste bestimmt, die dann in Abhängigkeit vom verwendeten Algorithmus z. B. als LOH (Verlust jeweils einer Genkopie >15 Mbp), TAI (Telomerlängenverluste bei einer der Schwesterallele) und LST (große Umlagerungen >10 Mbp innerhalb der Chromosomen) gezählt und zum HRD-Score aufsummiert werden¹⁶.

Die in den Pathologien angewendeten Analyseverfahren zur Bestimmung der genomweiten Biomarker müssen sich in der Sensitivität und Spezifität, Präzision und Richtigkeit mit den publizierten Verfahren, die für die Zulassung der jeweiligen Biomarker herangezogen wurden, messen⁴. Es ist also eine Validierung der verwendeten Sequenzier-technik notwendig und gegebenenfalls eine Verifizierung des für den genomweiten Biomarker verwendeten Panels (Tabelle 15). Zusätzlich sollten mindestens $n \geq 20$ Proben, die mit einem zugelassenen Verfahren auf den jeweiligen Biomarker vorgetestet wurden, als Goldstandard genutzt werden (Goldstandard-TMB: WES und Panel >1 Mb, MSI: Bethesda-PCR bzw. MMR-IHC, HRD: Myriad-Assay oder vergleichbarer Assay aus der Harmonisierungsstudie). Die Größe des Validierungskollektivs ist hierbei ganz stark abhängig von der Panelgröße, dem Umfang der synthetischen Referenz oder auch von den verwendeten Patientenproben, und es sollten verschiedene Qualitäts- und Tumorzellgehaltsparemeter berücksichtigt werden. Zusätzlich könnte eine Teilnahme an einem Ringversuch erfolgen.

Der Schwellenwert der benötigten Methode (TMB: zehn Mutationen pro Megabase, HRD: methodenabhängig, MSI: methoden- und entitätsabhängig) kann dabei für den

IH-IVD unter Umständen statt mit einem genauen Schwellenwert mit einem Grenzbereich (z. B. TMB: TMB low <8, TMB medium 8-12, TMB high >12 Mutationen pro Megabase) definiert werden. Es ist zu beachten, dass publizierte Schwellenwerte für die genomweiten Biomarker oft nur für bestimmte Entitäten validiert sind, daher kann je nach Entität nur ein Score bestimmt werden, aber keine Kategorie (z. B. MSI-H) angegeben werden. Insgesamt ist die Anzahl von untersuchten Proben mit ≥ 20 für die Validierung einer NGS-basierten Paneldiagnostik für jeden genomweiten Biomarker das Minimum (Tabelle 15).

Bei den genomweiten Biomarkern haben Tumorzellgehalt (TZG) und Nukleinsäurequalität einen starken Einfluss auf die Validität der Ergebnisse; Messbereich und Cut-off sollten daher besonders mit qualitativ schlechter DNA und grenzwertigem TZG bestimmt werden. Es gibt kommerziell erhältliche Referenzmaterialien unterschiedlicher DNA-Qualität, falls man hierfür nicht auf interne Proben zurückgreifen möchte.

Bei genomweiten Biomarkern ist aufgrund der großen Anzahl der Faktoren, die potenziell das Ergebnis beeinflussen, eine Überwachung der erwarteten Frequenzen anhand publizierter Daten notwendig. Da wegen der fehlenden Übermittlung von Ansprechraten kein PPV oder NPV in der Pathologie bestimmt werden kann, ist ein wiederholter Abgleich mit Daten des The Cancer Genome Atlas (TCGA) oder mit weiteren Quellen und eine erneute Verifizierung mit den ursprünglich ermittelten Qualitätsparametern bei einer Abweichung sicherzustellen. Außerdem ist die regelmäßige Teilnahme an Ringversuchen zu empfehlen.

Ein weiterer Fokus sollte auf der bioinformatischen Auswertung liegen, da hier schon geringe Veränderungen ausreichen, um falsche Ergebnisse zu liefern. Die Software muss im Rahmen der IVDR validiert sein, eine Versionierung der Software bei Änderungen und ein ständiger Abgleich der Häufigkeiten der positiven Werte mit Literaturdaten nach der Validierung sollte erfolgen¹⁷.

Tabelle 15:

Beispielhafte Berechnung der Probenanzahl zur Validierung von NGS-Panels mit genomweiten Biomarkern (hier beispielhaft TMB, mit Proben von TMB 4–15 Mutationen pro Megabase und Tumorzellgehalt 20–60 %) bei der Prüfung von Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität, Präzision und Nachweisgrenze (LOD). Analog sollte man bei MSI (pro Entität) und HRD vorgehen (Varianz Tumorzellgehalt, Probenqualität, gewünschter Biomarker)

	Anzahl	Verdünnung	Tage	Mitarbeiter *in	Genutzt für
Synthetische Referenz	3	1 : 1	A, B, C	A, B, C	Richtigkeit, Reproduzierbarkeit, Limit of Detection
Synthetische Referenz	3	1 : 5	A, B, C	A, B, C	Richtigkeit, Reproduzierbarkeit, Limit of Detection
Synthetische Referenz	3	1 : 10	A, B, C	A, B, C	Richtigkeit, Reproduzierbarkeit, Limit of Detection
Synthetische Referenz	3	1 : 20		A	Limit of Detection
Patientenproben	20	1 : 1		A	Inter-Assay-Konkordanz – Vergleich mit anderen Panels/ Methoden
Patientenproben mit unabhängigem Biomarkernachweis TMB	≥ 10	1 : 1		A	Genauigkeit
Gesamtzahl Proben	≥ 32				

Impressum

Herausgeber der Handreichung

Validierung Molekularpathologie:

Deutsche Gesellschaft für Pathologie e. V. (DGP)

Berufsverband Deutscher

Pathologinnen und Pathologen e.V. (BDP)

Autorinnen und Autoren

Michaela Angelika Ihle¹, Ivana Bratic Hench², Jan Budczies³,
Andreas Eckelt⁴, Sandra Ehrhardt^{5, 6}, Laura Esser⁷, Kim Falkenberg⁸,
Sebastian Grenz⁹, Sylvia Herold¹⁰, Katharina Ilm^{11, 12}, Andy Kahles³,
Sabine Merkelbach-Bruse¹, Christine Neuhaus⁷, Kerstin Rehm⁹,
Johannes Schmidpeter¹³, Udo Siebolts¹, Ana Terron Kwiatkowski¹¹,
Anna-Lena Volckmar³, Ginette Vornberger¹⁴, Andrea Waltenberger¹⁵,
Anna-Lena Wulf¹⁶

¹ Universität zu Köln, Medizinische Fakultät und Uniklinik Köln,
Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie,
Köln, Deutschland

² Universitätsspital Basel, Institut für Medizinische Genetik und
Pathologie, Basel, Schweiz

³ Universitätsklinikum Heidelberg, Institut für Allgemeine Pathologie
und Pathologische Anatomie, Heidelberg, Deutschland

⁴ IVDRconsulting UG, Niederkassel, Deutschland

⁵ Universitätsmedizin Halle, Department für Labormedizin,
Abteilung III, Halle, Deutschland

⁶ Universitätsmedizin Halle, Institut für Pathologie, Halle, Deutschland

⁷ Labor Dr. Wisplinghoff, Köln, Deutschland

⁸ Universitätsklinikum Münster, Gerhard-Domagk-Institut für
Pathologie, Münster, Deutschland

⁹ GENOPATH, überörtliche Teil-Berufsausübungsgemeinschaft für
Molekularpathologie GbR, Bonn, Deutschland

¹⁰ Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der Technischen
Universität Dresden, Institut für Pathologie, Dresden, Deutschland

¹¹ Technische Universität München, Institut für Pathologie, TUM
School of Medicine and Health, München, Deutschland

¹² Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie QuIP GmbH, Berlin,
Deutschland

¹³ Teilgemeinschaftspraxis Molekularpathologie Südbayern, München,
Deutschland

¹⁴ Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Institut für Pathologie,
Würzburg, Deutschland

¹⁵ PIZ - Patho Im Zentrum GmbH,
Molekularpathologie GIZ - Gene Im Zentrum, St. Pölten, Österreich

¹⁶ Universitätsklinikum Bonn (AÖR), Institut für Pathologie, Bonn,
Deutschland

Unterstützt durch

Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie (QuIP) GmbH

Deutsche Gesellschaft für Neuropathologie
und Neuroanatomie e.V. (DGNN)

Korrespondierende*r Autor*in:

Dr. rer. nat. Michaela A. Ihle

Universität zu Köln

Medizinische Fakultät und Uniklinik Köln

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

Molekularpathologische Diagnostik

Kerpener Straße 62

50924 Köln

michaela.ihle@uk-koeln.de