

Handbuch für Präanalytik VA-PA 4

INHALT

1.	ZIEL UND ZWECK .....	2
2.	ZUSTÄNDIGKEIT .....	2
3.	GELTUNGSBEREICH.....	2
4.	MITGELTENDE UNTERLAGEN.....	2
5.	VERFAHRENSBESCHREIBUNG .....	3
5.1.	GENERELLE HINWEISE ZUM VERSAND VON PRIMÄRPROBEN .....	3
5.2.	HINWEISE FÜR DEN VERSAND VON BLUTPROBEN ZUR ISOLIERUNG VON cfDNA .....	3
5.3.	HINWEISE FÜR DEN VERSAND VON PROBEN ZUR ENDPREDICT®-TESTUNG .....	3
5.4.	INFORMATIONEN ZUR EINSENDUNG VON PROBEN FÜR DIE LUNGEN-KREBS-ANALYSE IM NATIONALEN NETZWERK GENOMISCHE MEDIZIN (NNGM). .....	3
5.5.	INFORMATIONEN ZUR EINSENDUNG VON PROBEN FÜR DIE ANALYSE IM RAHMEN DES ZENTRUMS FÜR PERSONALISIERTE MEDIZIN (ZPM). .....	4
5.6.	INFORMATIONEN FÜR DIE EINSENDENDEN PATHOLOGEN .....	4
5.7.	LEISTUNGSKATALOG .....	5
5.7.1.	<i>Mutationsanalysen</i> .....	5
5.7.2.	<i>Erregernachweise</i> .....	6
5.7.3.	<i>Klonalitätsanalysen bei Lymphomverdacht (BZR- und TZR-Rearrangement)</i> .....	6
5.7.4.	<i>FISH-Analysen</i> .....	7
5.7.5.	<i>Sonstige Untersuchungen</i> .....	9
5.8.	PROBENANNAHME .....	10
5.9.	NOTWENDIGE INFORMATIONEN AUF DEM EINSENDESCHIN UNTERSUCHUNGSSCHIN .....	11
5.10.	HINWEISE ZUR FIXIERUNG DES GEWEBEMATERIALS .....	11
5.11.	HINWEISE ZUR ENTKALKUNG VON KNOCHENPROBEN .....	11
5.12.	ALLGEMEINE HINWEISE ZU DEN MOLEKULARPATHOLOGISCHEN ANALYSEN .....	12
5.12.1.	<i>Spezifische Hinweise für Mutationsanalysen</i> .....	13
5.12.1.1.	<i>Spezifische Hinweise für die Next-Generation Sequenzierung (NGS)</i> .....	14
5.12.2.	<i>Spezifische Hinweise für die FISH-Analysen</i> .....	20
5.12.3.	<i>Spezifische Hinweise für die Erregerdiagnostik</i> .....	20
5.12.4.	<i>Spezifische Hinweise für die Klonalitätsanalysen (Lymphomdiagnostik)</i> .....	21
5.12.5.	<i>Spezifische Hinweise für die MSI-Analyse</i> .....	21
5.13.	SPEZIFISCHE HINWEISE FÜR DIE HRD-ANALYTIK .....	21
5.14.	VERSAND DER INSPEKTIONSBERICHTE .....	21

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	1 von 22

Handbuch für Präanalytik VA-PA 4

### 1. Ziel und Zweck

Dieses Handbuch soll dem Einsender von Gewebeproben zur Durchführung einer molekularpathologischen Diagnostik als Leitfaden für die Behandlung der zu versendenden Proben dienen.

Für die Durchführung der molekularpathologischen Diagnostik wird in der Regel Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettetes Material (FFPE-Material) verwendet. Bedingt durch die Empfindlichkeit der diagnostischen Verfahren ist eine optimale Qualität des eingesandten Materials erforderlich.

Das vorliegende Handbuch soll den einsendenden Pathologen

- Hinweise für die Vorbehandlung und Fixierung geben,
- Informationen zu der Menge und Güte des benötigten FFPE-Materials liefern,
- über das Leistungsspektrum unserer Molekularpathologie informieren,
- weiterführende Informationen für die unterschiedlichen Untersuchungen bereitstellen,
- Notwendige Details zur Einsendung von Blutproben zur Gewinnung von cfDNA zur Mutationsanalyse bereitstellen (insb. zur EGFR T790M-Bestimmung).
- Informationen zur Einsendung von Proben für die Lungen-Krebs-Analyse im nationalen Netzwerk Genomische Medizin (nNGM) geben.
- Informationen zur Einsendung von Proben für die Analyse im Rahmen des Zentrums für Personalisierte Medizin (ZPM) geben.
- Informationen zur Einsendung von Proben für die EndoPredict-Testung geben.
- Informationen zur Einsendung von Proben für die HRD-Testung bereit stellen.

Es erhebt ferner keinen Anspruch auf Vollständigkeit und muss dem jeweiligen Kenntnisstand der Wissenschaft angepasst werden.

### 2. Zuständigkeit

Sekretariat	Schreiben der Befunde, Versand der Befunde, Rückfragen
Eingangslabor	Probenannahme, -kontrolle
Pathologen	Identifizierung der Analyseareale, Befunderstellung, medizinische Validation
MTA	Durchführung der molpath. Analysen

### 3. Geltungsbereich

Institut für Pathologie

### 4. Mitgeltende Unterlagen

[Anforderungsbogen für Zusatzuntersuchungen FB-PA 3](#)

[Begutachtungsauftrag FB-PA 1](#)

[Durchführung von Mutationsanalysen VA-VD 3](#)

[Erreger-Nachweise VA-VD 5](#)

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	2 von 22

[FISH-Analysen VA-VD 4](#)

[Gewebeschnitt-Herstellung und -Färbung VA-VD 7](#)

[Herzbiopsie-Analyse VA-VD 6](#)

[Klonalitätsanalyse VA-VD 2](#)

[Unvollständiger Probeneingang FB-PA 10](#)

## 5. Verfahrensbeschreibung

### 5.1. Generelle Hinweise zum Versand von Primärproben

Für den Versand von Primärproben für die gängige Molekularpathologie-Diagnostik können dem Einsender

- Gefäße (gefüllt mit 4%iger neutraler Formalinlösung, nur bis einer Gefäßgröße von 100ml),
- Einsendescheine,
- und Versandmaterial,

zur Verfügung gestellt werden. Bitte erfragen Sie nähere Informationen bei Frau Riede (0731/500-56359) oder fordern Sie eine Versandmaterial-Anforderung per Fax (0731/500-56384) an.

### 5.2. Hinweise für den Versand von Blutproben zur Isolierung von cfDNA

Für die Mutationsanalyse aus Blutproben („Liquid Biopsy“) senden Sie uns bitte mindestens 10ml in einem PAXgene Blood ccfDNA Tube (Qiagen, # 768115) oder ähnlich geeigneter spezifischer Röhrchen inkl. eines Überweisungsscheins sowie ggf. vorliegenden Ergebnissen vorheriger Mutationstestungen (z.B. vorheriger EGFR-Mutationstestungen) zu. So ist z.B. eine Angabe zu dem Ergebnis einer früheren EGFR-Mutationsanalyse wichtig für die klinische Beurteilung der Mutationsanalysen. Die Isolierung der cfDNA aus den Blutproben ist kein akkreditierter Prozess. Generell kann mit der aus dem Plasma gewonnen zirkulierenden Tumor-DNA (ctDNA) jegliche NGS-basierende DNA-Mutationsanalytik durchgeführt werden. Es gibt jedoch ggf. Einschränkungen aufgrund der ctDNA-Menge und -Güte.

### 5.3. Hinweise für den Versand von Proben zur EndoPredict®-Testung

Bitte fordern Sie für die Übersendung der Proben für die EndoPredict®-Testung von uns die EndoPredict®-Testbox an. In dieser Testbox sind die relevanten Unterlagen und Formulare beinhaltet. Bitte füllen Sie diese Unterlagen aus und senden Sie diese wie auch ggf. die relevante Tumorprobe zu. Je nachdem, ob die Patientin PKV oder GKV versichert ist, müssen unterschiedliche Formulare verwendet werden. Bei Unklarheiten können Sie uns jederzeit kontaktieren.

### 5.4. Informationen zur Einsendung von Proben für die Lungen-Krebs-Analyse im nationalen Netzwerk Genomische Medizin (nNGM).

Seit 2018 erfolgt eine Analyse von FFPE-Gewebe von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) im Rahmen des nNGM-Verbundes. Diese Analyse umfasst neben immunhistochemischen Untersuchungen eine nach Plattenepithel- und Adenokarzinom stratifiziertes molekularpathologisches

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	3 von 22

Handbuch für Präanalytik VA-PA 4

Programm welches FISH-, RNA-Fusionstranskript- sowie NGS-Panel-Sequenzierungs-Untersuchungen umfasst. Die Vorgaben für das Gewebe gleicht den allgemeinen Vorgaben für die Molekularpathologie.

**Falls Sie Interesse an einer NSCLC-Analyse im nNGM-Verbund haben, kontaktieren Sie bitte uns oder wenden sich an den Prof. Dr. Stefan Stilgenbauer oder Dr. Eugen Tausch (CCCU).**

**5.5. Informationen zur Einsendung von Proben für die Analyse im Rahmen des Zentrums für Personalisierte Medizin (ZPM).**

Die Zentren für Personalisierte Medizin (ZPM) wurden als Basis einer flächendeckenden, regional koordinierten Versorgungsstruktur eingerichtet und zum 15.11.2019 durch den Landeskrankenhausausschuss ausgewiesen. Im Rahmen der Analytik für das ZPM erfolgt eine umfangreiche molekularpathologische Analyse sowie eine Diskussion der Ergebnisse im Molekularen und Familiären Tumorboard (MoFa). Eine Anmeldung erfolgt unter:

Telefon 0731 500-56056

Telefax 0731 500-56055

E-Mail [sekr.cccu@uniklinik-ulm.de](mailto:sekr.cccu@uniklinik-ulm.de)

**Einschlusskriterien:**

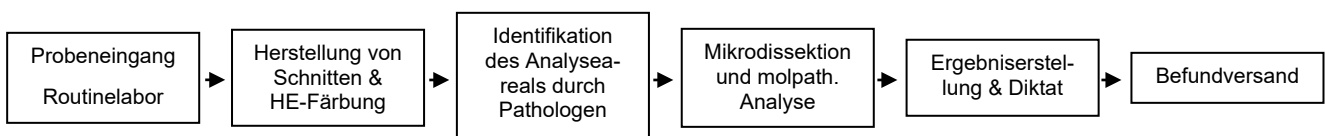
- Patientinnen und Patienten mit seltenen oder fortgeschrittenen Tumoren, oder mit Tumordispositionssyndromen
- Eine systemische Behandlung ist angezeigt
- Zugelassene Therapien stehen in dieser Indikation nicht mehr zur Verfügung
- Eine molekulargenetische Untersuchung soll erfolgen oder ist angedacht

Die Vorgaben für das Gewebe für die Analytik im ZPM gleicht den allgemeinen Vorgaben für die Molekularpathologie.

**5.6. Informationen für die einsendenden Pathologen**

Bitte senden Sie für die Durchführung von molekularpathologischen Untersuchungen nach Möglichkeit das bereits fertige FFPE-Material als **Blöcke** ein. Im Institut werden die notwendigen weiterführenden Schritte durchgeführt (s. Abb. 1). Je nach gewünschter Untersuchung (Leistungskatalog, s. u.) sind aber unterschiedliche Details zu beachten, welche weiter unten kurz dargestellt sind.

Abb. 2 Ablaufschema molekularpathologische Analysen



**Ansprechpartner**

<b>Mutationsanalytik</b>	Prof. Dr. Ralf Marienfeld	Tel.: 0731 500 56306	ralf.marienfeld@uniklinik-ulm.de
<b>Next-Generation Sequenzierung</b>	Prof. Dr. Ralf Marienfeld	Tel.: 0731 500 56306	ralf.marienfeld@uniklinik-ulm.de

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	4 von 22

**Handbuch für Präanalytik VA-PA 4**

<b>Liquid Biopsy</b>	Prof. Dr. Ralf Marienfeld	Tel.: 0731 500 56306	ralf.marienfeld@uniklinik-ulm.de
<b>nNGM-Analytik</b>	Uwe Gerstenmaier	Tel.: 0731 500 56322	uwe.gerstenmaier@uniklinik-ulm.de
<b>HRD-Analytik</b>	Prof. Dr. Ralf Marienfeld	Tel.: 0731 500 56306	ralf.marienfeld@uniklinik-ulm.de
<b>ZPM/MoFa</b>	Prof. Dr. Ralf Marienfeld	Tel.: 0731 500 56306	ralf.marienfeld@uniklinik-ulm.de
<b>EndoPredict</b>	Prof. Dr. Ralf Marienfeld	Tel.: 0731 500 56306	ralf.marienfeld@uniklinik-ulm.de
<b>Erregernachweis/ Klonalitätsanalytik</b>	PD Dr. Frank Leithäuser	Tel.: 0731 500 56380	frank.leithaeuser@uniklinik-ulm.de
<b>FISH-Analytik</b>	Prof. Dr. Thomas Barth	Tel.: 0731 500 56300	thomas.barth@uniklinik-ulm.de

## 5.7. Leistungskatalog

Folgende Molekularpathologische Analysen sind am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm etabliert (siehe auch FB-EL 1). Der Hauptteil der aufgeführten Analysen sind nach der DIN ISO/EN 17020 akkreditiert, Ausnahmen sind gekennzeichnet. Gerne sind wir bereit nach vorheriger Absprache neue Analysen einzuführen.

### 5.7.1. Mutationsanalysen

Nachweis	Methodik	Indikation
EGFR-Mutationsanalyse (Exon 18,19, 20, 21)	PCR/ Sequenzierung/NGS	Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Kolon-Karzinom u.a.
EGFR-T790M	PCR/ Sequenzierung/NGS	Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Resistenztestung
C-KIT-Mutationsanalyse (Exon 9, 11, 13, 17)	PCR/ Sequenzierung/NGS	GIST / Mastozytose, Melanom
C-KIT-Mutationsanalyse (Exon 10)	PCR/ Sequenzierung/NGS	GIST / Mastozytose, Melanom
JAK2-Mutationsanalyse (Exon 12, nt 1849)	PCR/ Pyro-Sequenzierung/NGS	Myeloproliferative Neoplasien
BRAF-Mutationsanalyse (Exon 15, Codon 600)	PCR/ Sequenzierung/NGS	Schilddrüsenkarzinom, Colonkarzinom, Melanom
K-RAS-Mutationsanalyse (Exon 2, 3 und 4)	PCR/ Sequenzierung/NGS	Kolorektale Karzinome, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom u.a.
PDGFRa-Mutationsanalyse (Exon 18)	PCR/ Sequenzierung/NGS	GIST / Mastozytose, Melanom
IDH1/2-Mutationsanalyse	PCR/ Sequenzierung/NGS	Astrozytome, Oligodendrogliome und Anaplastischen Gliome, Glioblastom
N-RAS-Mutationsanalyse (Codon Exon 2, 3 und 4)	PCR/ Sequenzierung/NGS	Malignome u.a.
APC-Mutationsanalyse	PCR/ Sequenzierung/NGS	familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) u.a.
NPM1-Mutationsanalyse	PCR/ Sequenzierung/NGS	akute myeloische Leukämie

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	5 von 22

**Handbuch für Präanalytik VA-PA 4**

CTNNB1-Mutationsanalyse	PCR/ Sequenzierung/NGS	familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), aggressive Fibromatose, u.a.
C-MET-Mutationsanalyse	PCR/ Sequenzierung/NGS	Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Kolon-Karzinom u.a.
FGFR3-Mutationsanalyse	PCR/ Sequenzierung/NGS	u.a. Melanom
GNAS1-Mutationsanalyse	PCR/ Sequenzierung/NGS	z.B. V.a. fibröse Dysplasie
EHZ2 (Exon 2-20)	PCR/ Sequenzierung/NGS	Lymphome
HerzneuV695	PCR/ Sequenzierung/NGS	Li Fraumeni Syndrom
PIK3CA-Mutationsanalyse	PCR/ Sequenzierung/NGS	Kolorektale Karzinome
H3F3A	PCR/Sanger-Sequenzierung/NGS	V.a. Riesenzelltumor
H3F3B	PCR/ Sequenzierung/NGS	V.a. Riesenzelltumor, Hirntumor
MYD88	PCR/ Sequenzierung/NGS	B-Zell-Lymphom
CD79B	PCR/ Sequenzierung/NGS	B-Zell-Lymphom

**5.7.2. Erregernachweise**

Nachweis	Methodik	Indikation
HSV-Nachweis	PCR	HSV-Infektion, ulzeröse Ösophagitiden u.a.
HHV8-Nachweis	Nested PCR	Kaposi-Sarkom, der Morbus Castleman u.a.
EBV-Nachweis	Nested PCR	nasopharyngeales Karzinom, aggressive B-Zell-Lymphome u.a.
HPV-Nachweis+Typisierung	PCR/Sanger-Sequenzierung	Zervixkarzinom u.a.
TBC-Nachweis	Nested PCR	Tuberkulose
Treponema-Pall.-Nachweis	Nested PCR	Syphilis
ADV-Nachweis	Nested PCR	V. a. Myocarditis
HHV6-Nachweis	Nested PCR	V. a. Myocarditis
PVB19-Nachweis	Nested PCR	V. a. Myocarditis
Coxsackie-Virus-Nachweis	Nested PCR	V. a. Myocarditis

**5.7.3. Klonalitätsanalysen bei Lymphomverdacht (BZR- und TZR-Rearrangement)**

Nachweis	Methodik	Indikation
----------	----------	------------

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	6 von 22

**Handbuch für Präanalytik VA-PA 4**

IgH-Analyse (Fr1, Fr2, Fr3)	Multiplex PCR + Kapillarelektrophorese	V. a. B-Zell-Lymphom
Igκ-Analyse (BZR, IgH)	Multiplex PCR + Kapillarelektrophorese	V. a. B-Zell-Lymphom
TCRγ-Analyse	Multiplex PCR + Kapillarelektrophorese	V. a. T-Zell-Lymphom
TCRβ-Analyse	Multiplex PCR + Kapillarelektrophorese	V. a. T-Zell-Lymphom

**5.7.4. FISH-Analysen**

FISH mit Amplifikationssonden		
CDK4-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Liposarkom
CDKN2A/9Cen-FISH	FFPE-Gewebematerial	u.a. V. a. ALL
C-MET	FFPE-Gewebematerial	Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Kolon-Karzinom u.a.
EGFR Amplifikation	FFPE-Gewebematerial	NSCLC u. a.
ERG1/5p15 (5q-)-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. akute myeloide Leukämie oder myelodysplastisches Syndrom
FGFR1	FFPE-Gewebematerial	Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, u.a.
HER2-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Mamma-Karzinom
MDM2-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Liposarkom
NMYC-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Neuroblastom
P53-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Chronische Lymphatische Leuk- ämie, Multiples Myeloma u.a.
19q13/19p13	FFPE-Gewebematerial	Astrocytom, Oligodendrogliom Oli- goastrocytom
1p36/1q25	FFPE-Gewebematerial	Astrocytom, Oligodendrogliom Oli- goastrocytom

FISH mit Bruchanalyse-Sonden		
BCL2-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Follikuläres Lymphom, V. a. Non- Hodgkin-Lymphom, DLBCL, Burkitt- Lymphom, etc.
BCL6-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Follikuläres Lymphom, V. a. Non- Hodgkin-Lymphom, DLBCL, Burkitt- Lymphom, etc.
BCL2/BCL6 Triple Color-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Follikuläres Lymphom V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, DLBCL, Burkitt-Lymphom, etc.
BCL10-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. MALT-Lymphom u.a.
CCND1	FFPE-Gewebematerial	V. a. Mantelzell-Lymphom, Lympho- proliferative Erkrankungen

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	7 von 22

**Handbuch für Präanalytik VA-PA 4**

CIC	FFPE-Gewebematerial	Analyse von Rundzelligen Sarkomen
CMYC-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, Multiples Myelom, Burkitt-Lymphom u.a.
DDIT3-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. myxoides Liposarkom
ETV6-FISH	FFPE-Gewebematerial	Akute lymphoblastische Leukämie, infantiles Fibrosarkom
EWSR1-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Ewing-Sarkom
FGFR1	FFPE-Gewebematerial	z. B. Lungen-, Brust-, Prostatatumore
FOXO1A-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Rhabdomyosarkom u.a.
FUS-FISH	FFPE-Gewebematerial	Sarkome, AML, Histiozytome
IGH-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Non-Hodgkin-Lymphom (insb. Burkitt), Multiples Myelom
Ig kappa-FISH	FFPE-Gewebematerial	Variante Translokationen (t(2;8)), z. B. bei Burkitt-Lymphom
Ig lambda-FISH	FFPE-Gewebematerial	Variante Translokationen (t(8;22)), z. B. bei Burkitt-Lymphom
IRF4/DUSP22	FFPE-Gewebematerial	Analyse von DLBCL
JAZF1	FFPE-Gewebematerial	V. a. endometriales Stroma-Sarcom
MAML2	FFPE-Gewebematerial	V. a. Mucoepidermoidtumor
MALT1-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. MALT-Lymphom
MYB-FISH	FFPE-Gewebematerial	V.a. Chronische lymphocytische Leukämie (CLL), akute lymphoblastische Leukämie (ALL), B-cell small lymphocytic lymphoma (SLL), Plasmazell Myelom
NR4A3-FISH	FFPE-Gewebematerial	Extraskeletale myxoide Chondrosarcome (EMCs)
NTRK 1	FFPE-Gewebematerial	Alle Tumoren
NTRK 2	FFPE-Gewebematerial	Alle Tumoren
NTRK 3	FFPE-Gewebematerial	Alle Tumoren
NUTM1-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. NUT Mittellinie Karzinom
PDGFRB	FFPE-Gewebematerial	z. B. Myelodysplastic Syndrome/Myeloproliferative Disease (MDS/MPD)
RET-FISH	FFPE-Gewebematerial	Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
ROS1-FISH	FFPE-Gewebematerial	Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
TFEB	FFPE-Gewebematerial	V. a. Nierenzellkarzinom
TFE3	FFPE-Gewebematerial	V. a. Nierenzellkarzinom
USP6-FISH	FFPE-Gewebematerial	V.a. Aneurysmatische Knochenzyste
WWTR1	FFPE-Gewebematerial	V. a. epithelioides Hämangioendotheliom

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	8 von 22



**Handbuch für Präanalytik VA-PA 4**

YWHAЕ-FAM22	FFPE-Gewebematerial	V. a. endometriales Stroma-Sarcom, Klarzell-Sarkom
-------------	---------------------	--

**FISH mit Translokations-Sonden**

ALK/EML4-FISH	FFPE-Gewebematerial	Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
BCR/ABL-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. chronische myeloische Leukämie
CCND1/IGH-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Mantel-Zell-Lymphom, Multiples Myelom, MALT-Lymphom
CMYC/IGH-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, Multiples Myelom, Burkitt-Lymphom u.a.
COL1A1/PDGFB (17; 22)-FISH	FFPE-Gewebematerial	V.a. Dermatofibrosarcoma Protuberans
EWSR1/NFATc2, t(20;22)	FFPE-Gewebematerial	Analyse von Rundzelligen Sarkomen
FGFR3/IgH-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Multiples Myelom
FOXO1A/PAX3 t(2; 13)-FISH	FFPE-Gewebematerial	V.a. Rhabdomyosarcom
FOXO1A/PAX7 t(1; 13)-FISH	FFPE-Gewebematerial	V.a. Rhabdomyosarcom
IGH/BCL2-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, DLBCL, Burkitt-Lymphom, etc.
IgH/MAF-FISH	FFPE-Gewebematerial	V.a. Myelom, Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS)
MALT1/IGH-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, MALT-Lymphom
MALT1/BIRC3-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, MALT-Lymphom
RUNX1/RUNX1T1	FFPE-Gewebematerial	V.a. akute myeloide Leukämie
SMARCB1/22q12	FFPE-Gewebematerial	Analyse von Rhabdoide Tumoren
SS18/SSX1 Tricolor FISH	FFPE-Gewebematerial	V.a. Synovialsarkom
4q12 TriColor Rearrangement (FIP1L1/PDGFRΑ)	FFPE-Gewebematerial	V.a. idiopathic hypereosinophilic syndrome (HES)

**Besondere FISH-Analysen**

Melanom Sondensatz (RReB1 + 6 cent, MYB, CCND1) FISH	FFPE-Gewebematerial	Melanom
X, Y Chromos. FISH	FFPE-Gewebematerial	Identitätsbestimmung i. Gewebeproben
11q gain/loss Triple Color	FFPE-Gewebematerial	V. a. Burkitt-like Lymphom mit 11q-Aberration

**5.7.5. Sonstige Untersuchungen**

Nachweis	Methodik	Indikation
----------	----------	------------

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	9 von 22

**Handbuch für Präanalytik VA-PA 4**

MGMT-Promotormethylierung	Bisulfitkonversion/Pyro-Sequenzierung	Glioblastom
MLH1-Promotormethylierung	Bisulfitkonversion/Pyro-Sequenzierung	HNPCC-Verdacht
MSI (bei HNPCC-Verdacht)	Multiplex-PCR/Kapillar-Elektrophorese	HNPCC-Verdacht
STR-Analyse zur Identitätsprüfung	Multiplex-PCR/Kapillar-Elektrophorese	Identitätsprüfung von Gewebe
<b>Expressionsanalysen</b>		
EndoPredict®	Multiplex-qPCR-Expressionsanalyse	Mamma-CA
<b>Next-Generation-Sequenzierung/Panel-Sequenzierung (s. 5.10.1.1)</b>		
BRCA 1/2 Mutationsanalyse	Multiplex-PCR/NGS	Ovarialkarzinom Eileiterkarzinom Primäres Peritonealkarzinom
Human Actionable Solid Tumor Panel	Multiplex-PCR/NGS	Solide Tumore
Human Comprehensive Cancer Panel	Multiplex-PCR/NGS	Solide Tumore
Human Tumor Mutational Burden Panel	Multiplex-PCR/NGS	Solide Tumore
Lymphom Panel	Multiplex-PCR/NGS	V. a. Lymphom
Myeloid Panel	Multiplex-PCR/NGS	V. a. Chronische myeloische Leukämie u. ä.
Neuro Panel	Multiplex-PCR/NGS	V.a. Gliome, Astrozytome, etc.
nNGM Panel	Multiplex-PCR/NGS	Nicht-kleinzellige Lungentumore
HRD Panel	Multiplex-PCR/NGS	V.a. homologen Reparaturdefekt (Prostata-, Ovarial- Karzinom)
Archer FusionPlex Sarcoma Panel	RNA/Multiplex-PCR/NGS	Solide Tumore
Archer FusionPlex ExtendedSarcoma Panel	RNA/Multiplex-PCR/NGS	Solide Tumore
Archer FusionPlex Lung Panel	RNA/Multiplex-PCR/NGS	Solide Tumore, NSCLC
<b>Hybridisierungsanalytik</b>		
Infinium EPIC850K Chip	Methylierungsanalytik	ZNS-Tumore

**5.8. Probenannahme**

Es werden zu folgenden Zeiten – oder nach vorheriger Absprache - Proben angenommen und bearbeitet:

Montag	07.00 Uhr bis 16.00 Uhr
Dienstag	07.00 Uhr bis 16.00 Uhr
Mittwoch	07.00 Uhr bis 16.00 Uhr

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	10 von 22

**Handbuch für Präanalytik VA-PA 4**

Donnerstag 07.00 Uhr bis 16.00 Uhr

Freitag 07.00 Uhr bis 16.00 Uhr

### 5.9. Notwendige Informationen auf dem Einsendeschein Untersuchungsschein

Folgende Angaben sollen auf dem Untersuchungsschein leserlich vermerkt werden:

- Nachname, Vorname, Geburtsdatum, Adresse des Patienten
- Vertragsarztnummer, Krankenhaus, ggf. Station
- Absender (Adresse des einsendenden Arztes)
- Einsendedatum
- Untersuchungsmaterial/Klinische Diagnose
- Ergebnisse von histologischen Voruntersuchungen / Vorbefunde
- Klinische Fragestellung bzw. spezifischer Untersuchungsauftrag
- Anatomischer Entnahmeort der Probe / des Untersuchungsguts
- (Angaben über Bestrahlung des Tumors und ggf. Vorbehandlung der Probe)

Bei fehlenden oder widersprüchlichen Angaben erfolgt nach Möglichkeit eine sofortige Rückfrage beim Einsender.

### 5.10. Hinweise zur Fixierung des Gewebematerials

Die Formalin-Fixierung des Gewebes ist ein kritischer Schritt, der die nachfolgenden molekularpathologischen Untersuchungen wesentlich beeinflussen kann, da z. B. eine „Überfixierung“ des Gewebes eine stark beeinträchtigte DNA-Qualität nach sich ziehen kann. Um Ihnen als Einsender eine kleine Hilfe an die Hand zu geben, sind im Folgenden die Verfahrensweisen zur Herstellung von FFPE-Materialien im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm dargestellt:

#### **Verfahren:**

Die Gewebeproben werden in geeignete Behälter für ca. 12 Stunden (abhängig von Art und Größe der Probe) in eine neutral gepufferte 4%igen Formalin-Lösung bei Raumtemperatur gelegt. Es wird empfohlen für die Fixierung ca. das 20fache Volumen des zu fixierenden Gewebes zu verwenden.

Geeignete neutral gepufferten 4%igen Formalin-Lösungen sind kommerziell erhältlich. Geeignete Lösungen sind z. B.:

Formaldehyd 4% gepuffert methanolarm (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik)

Formaldehyd-Lösung gepuffert (Fishar)

### 5.11. Hinweise zur Entkalkung von Knochenproben

Vor der Paraffin-Einbettung von Knochengewebe, wie z.B. von Knochenstanzen, erfolgt in der Regel die Entkalkung des Gewebes. Auch der Entkalkungsprozess bzw. die dafür verwendeten Lösungen und Reagenzien können eventuell nachfolgende molekularpathologische Analysen wesentlich beeinflussen. Um Ihnen als Einsender eine kleine Hilfe an die Hand zu geben, sind im Folgenden die Verfahrensweisen und Materialien dargestellt, die im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm für die Entkalkung von Knochenge-

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	11 von 22

Handbuch für Präanalytik VA-PA 4

webe für die nachfolgende FFPE-Materialherstellung bzw. molekularpathologische Analysen angewendet werden.

**Verfahren:**

Das Knochengewebe wird in EDTA-Entkalkungs-Lsg. gelegt (Probe muss vollständig bedeckt sein) und darin für mindestens 18–24 Stunden **bei 37°C** belassen. Nach 24 Stunden erfolgt eine Sicht- und Druckkontrolle. Falls die Entkalkung noch nicht vollständig abgeschlossen ist, dann wird die Gewebeprobe so lange in der EDTA-Entkalkungs-Lsg. belassen, bis der Prozess abgeschlossen ist (mindestens aber für weitere 24 Stunden).

Wichtig: Die EDTA-Entkalkungs-Lsg. muss jeweils nach 24 Stunden ausgetauscht werden.

**EDTA-Entkalkungslsg. (2% EDTA in neutral gepufferten Formalin), für 2l Ansatz**

EDTA (z.B. Triplex III, Merck, 1.08418.5000)	400g
4%ige Formalin-Lsg (z.B. von Fishar, siehe oben)	2000ml
NaOH-Plättchen	ca. 40g

Der pH-Wert wird mit NaOH (fest, Lösung) auf 7,2 – 7,4 eingestellt.

Wichtig: Bitte vermeiden Sie bei der Entkalkung den Einsatz von Säuren, da dies zu einer starken Beeinträchtigung der DNA-Qualität führt.

**5.12. Allgemeine Hinweise zu den molekularpathologischen Analysen**

Bitte senden Sie uns nach Möglichkeit **Blöcke** zu, von denen die notwendigen Schnitte hergestellt werden können.

**Nachweis und Verdünnungsgrenzen**

Wichtige Punkte, die in einem engen Zusammenhang mit den benötigten Materialmengen stehen, sind die Nachweis- und Verdünnungsgrenzen der durchgeführten molekularpathologischen Analysen. Grob gesagt handelt es sich bei der Nachweisgrenze um den Anteil an spezifischer DNA (z. B. mutierter DNA oder Erreger-DNA) in der eingesetzten Gesamt-DNA.

Die Verdünnungsgrenze ist die Probenmenge (z. B. ng DNA, etc.), die benötigt wird, um eine Analyse (PCR ± nachfolgende Sequenzierung) erfolgreich durchführen zu können. Die Verdünnungsgrenze ist sehr variabel und hängt von folgenden Faktoren ab:

- Größe der Gewebeprobe bzw. des Analyseareals.
- Art, Herkunft und Vorbehandlung der Proben.
- Störfaktoren (s.u.).
- Analysespezifische Variabilität.

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	12 von 22

Handbuch für Präanalytik VA-PA 4

### Störfaktoren

Störfaktoren sind allgemeine Faktoren, die den Erfolg der molekularpathologischen Analysen negativ beeinflussen oder gar verhindern können.

- „Überfixierung“
- Entkalkungsprozess
- PCR-inhibierende Substanzen in der Gewebeprobe (z. B. Melanin, Hämoglobin, etc.)
- Bestrahlung des Patienten / des Tumors
- Nekrose des Gewebes

#### 5.12.1. Spezifische Hinweise für Mutationsanalysen

Die oben aufgeführten Mutationsanalysen erfolgen in der Regel durch eine PCR-vermittelte Amplifikation des zu untersuchenden DNA-Bereichs gefolgt von entweder einer Sanger-Sequenzierung, einer Pyro-Sequenzierung oder einer NGS-Panel-Sequenzierung. **In der Regel streben wir eine NGS-basierte Sequenzierung an.** Im Folgenden sind die wichtigsten Punkte zusammengefasst, die Sie bei der Beauftragung von molekularpathologischen Untersuchungen durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm beachten müssen:

#### Nachweisgrenzen:

Für DNA, die aus FFPE-Gewebe isoliert wird, gelten folgende Nachweisgrenzen:

- 10-20% mutierte DNA bei Nachweisen, die mittels Sanger-Sequenzierungen durchgeführt werden.
- 5-10% mutierte DNA bei Nachweisen, die mittels Pyro-Sequenzierungen durchgeführt werden.
- 3-5% mutierte DNA bei Nachweisen, die mittels NGS-Sequenzierungen durchgeführt werden.

Für zellfreie DNA (cfDNA) bzw. frei Tumor-DNA (ctDNA), die aus Liquid-Biopsy-Proben (z.B. Blut) isoliert wird, gilt folgende Nachweisgrenzen:

- $\geq 1\%$  mutierte DNA bei Nachweisen, die mittels NGS-Sequenzierungen durchgeführt werden. Es kann nicht vorhergesagt werden, wie hoch der Anteil der spezifischen Tumor-DNA an der isolierten zellfreien DNA sein wird.

Das bedeutet, dass möglichst Proben mit hohem relevantem Tumor-Anteil (**nach Möglichkeit sollte ein 50-80% eines Areals des Schnittes Tumorzellen sein**) ausgewählt werden sollten.

Dieser hohe Tumoranteil ist notwendig, da zudem die Möglichkeit besteht, dass der Tumor bezüglich der zu analysierenden Mutation heterogen sein kann und somit nicht jede Tumorzelle die Mutation trägt.

#### Benötigte Materialmenge (Gewebe)

- In der Regel wird Material für 2 – 3 Schnitte (5  $\mu$ m) mit ausreichendem Analyseareal benötigt.
- Größe des Analyseareals: Nach Möglichkeit 0,5 – 1 cm<sup>2</sup>

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	13 von 22

Handbuch für Präanalytik VA-PA 4

- Empfohlener Tumoranteil im Analyseareal: ca. 50-80%.
- Die Zugänglichkeit der Gewebeprobe wird wesentlich durch Art und Herkunft sowie durch die Vorbehandlung des Gewebes beeinflusst.

**Benötigte Materialmenge (Blut)**

Für die Mutationsanalyse aus Blutproben („Liquid Biopsy“) senden Sie uns bitte mindestens 10ml in einem PAXgene Blood ccfDNA Tube (Qiagen, # 768115) oder ähnlich geeigneter spezifischer Röhren.

**Bitte kontaktieren Sie uns, um weitere Informationen zu erhalten.**

**5.12.1.1. Spezifische Hinweise für die Next-Generation Sequenzierung (NGS)**

Für die Mutationsanalytik mittels NGS steht im Hause ein MiSeq- sowie ein NextSeq-Gerät (Illumina) zur Verfügung. Momentan verwenden wir für die Tumordiagnostik eine Amplicon-basierte Re-Sequencing Technologie von QIAGEN für die NGS-basierte Mutations-Analytik und FusionPlex-Panels der Firma Archer für den Nachweis von Fusionstranskripten. Beide Technologien erlauben mit Hilfe von „unique molecular identifier“ eine Nachweisgrenze von 5% Varianten-Allelfrequenz (für die Mutations-Analytik) bzw. ein hochsensitiver Nachweis von Fusionstranskripten. Im Einzelfall kann diese Nachweisgrenze auf 1% herabgesenkt werden (z.B. bei ctDNA-Analysen), jedoch zu Lasten der Zuverlässigkeit. Alle aufgeführten Genbereiche werden parallel sequenziert, es werden jedoch **nur die angeforderten Untersuchungen abgerechnet**. Die Ergebnisse der zusätzlichen Sequenzierungen können jederzeit auf Anfrage ausgewertet werden.

Bitte beachten Sie, dass die beantragte Testung ausschließlich der Untersuchung auf (therapierelevante) somatische Mutation im Tumorgewebe dient. Die Untersuchung stellt **keine** Keimbahnanalytik dar, erlaubt auch **keine** Keimbahnaussage und erfordert **keine** Aufklärung gemäß Gendiagnostikgesetz.

Für die Auswahl und nachfolgende Anforderung der NGS-basierten Mutations- und Fusionstranskript-Analysen ist weiter unten unser Portfolio aufgeführt. Bei Unklarheiten können Sie uns jederzeit kontaktieren.

**Nachweisgrenzen:**

- 5% mutierte DNA (In Einzelfällen <5%)

Obwohl diese Methode sehr sensitiv ist, ist es ratsam, dass möglichst Proben mit hohem relevantem Tumor-Anteil (**nach Möglichkeit sollte ein 50-80% eines Areals des Schnittes Tumorzellen sein**) ausgewählt werden.

Dieser hohe Tumoranteil ist notwendig, da zudem die Möglichkeit besteht, dass der Tumor bezüglich der zu analysierenden Mutation heterogen sein kann und somit nicht jede Tumorzelle die Mutation trägt.

**Benötigte Materialmenge**

- In der Regel wird Material für 2 – 3 Schnitte (5 µm) mit ausreichendem Analyseareal benötigt.
- Bitte senden Sie uns nach Möglichkeit einen FFPE-Block
- Größe des Analyseareals: Nach Möglichkeit 0,5 – 1 cm<sup>2</sup>
- Empfohlener Tumoranteil im Analyseareal: ca. 50-80%.

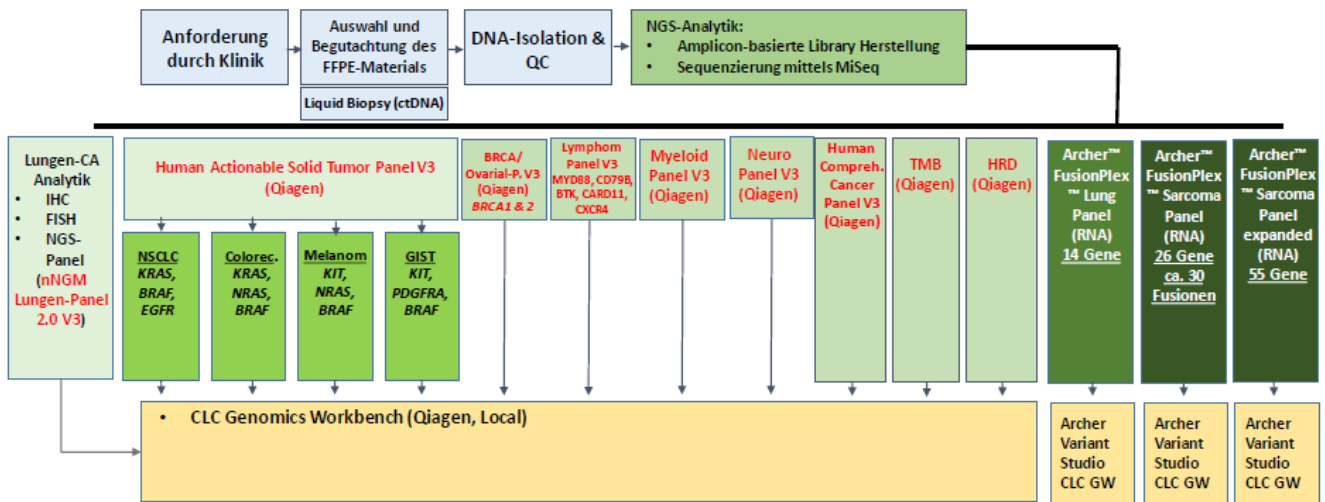
Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	14 von 22

Handbuch für Präanalytik VA-PA 4

- Die Zugänglichkeit der Gewebeprobe wird wesentlich durch Art und Herkunft sowie durch die Vorbehandlung des Gewebes beeinflusst.

**Bitte kontaktieren Sie uns, wenn Sie Fragen zur NGS-Mutationsanalytik inkl. der Auswahl der Methodik bzw. des Panels haben.**

Leistungsspektrum der auf NGS basierenden Mutations- und Fusionstranskript-Analytik



Human Actionable Solid Tumor Panel (V3 Panel)

- 20 - 80ng DNA
- Coverage ca. 5000X/mind. 100X UMI-Reads
- Nachweisgrenze 5 (3)%

**Exons**

BRAF, PDGFRA, EGFR (ERBB1), KRAS, NRAS, KIT (CD117).

**Hotspots**

AKT1, ALK, CTNNB1, ERBB3, ESR1 (ERa), FOXL2, GNA11, GNAQ, IDH1, IDH2, MET, RAF1, RET.

**Whole Coding Region**

ERBB2 (HER-2, NEU), PIK3CA (p110-alpha), TP53 (p53)

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	15 von 22

## nNGM-Lungen Panel (Qiagen, V3)\_Version 2

- 20 - 80ng DNA
- Coverage ca. 5000X/mind. 100X UMI-Reads
- Nachweisgrenze 5 (3)%

Genliste:

**ALK** (Ex. 22 - 25), **BRAF** (Ex. 11, 15), **CTNNB1** (Ex. 3), **EGFR** (Ex. 18 - 21), **FGFR1** (Ex. 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 15), **FGFR2** (Tr-A\*: 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15; Tr-B\*: 8, 9, 12, 18), **FGFR3** (Ex. 3, 6, 7, 9, 10, 12, 14, 16, 18), **FGFR4** (Ex. 3, 6, 9, 12, 13, 15, 16), **HER2** (Ex. 8, 19, 20), **IDH1** (Ex. 4 (R132X)), **IDH2** (Ex. 4 (codon 140, 172)), **KRAS** (Ex. 2 - 4), **MAP2K1** (Ex. 2, 3), **MET** (Ex. 14, 16 - 19 / Intron 13, erste 100bp von Intron 14), **NRAS** (Ex. 2 - 4), **PIK3CA** (Ex. 8, 10, 21), **PTEN** (Ex. 1-8), **ROS1** (Ex. 34 - 41), **TP53** (Ex. 4 - 8), **RET** (Ex. 10 - 18), **HRAS** (Ex. 2 - 4), **STK11** (Ex. 1 - 9), **NTRK1** (Ex. 13 - 17), **NTRK2** (Ex. 14 - 19), **NTRK3** (Ex. 15 - 20), **KEAP1** (Ex. 2 - 6)

## Human BRCA Panel (Qiagen)

- 20 - 80ng DNA
- Coverage ca. 5000X/mind. 100X UMI-Reads
- Nachweisgrenze 5 (3)%

Genliste:

BRCA1 BRCA2

## Lymphom Panel (Qiagen) V3

- 20 - 80ng DNA
- Coverage ca. 5000X/mind. 100X UMI-Reads
- Nachweisgrenze 5 (3)%

Genliste:

MYD88, CD79B, CARD11, BTK, CXCR4

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	16 von 22



Handbuch für Präanalytik VA-PA 4

**Myeloid Panel (Qiagen) V3**

- 20 - 80ng DNA
- Coverage ca. 5000X/mind. 100X UMI-Reads
- Nachweisgrenze 5 (3)%

**Genliste**

ASXL1, CALR, CEBPA, CSF3R, DNMT3A, EZH2, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3  
KIT, MPL, NFKBIE, NPM1, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1

**Neuro Panel (Qiagen) V3**

- 20 - 80ng DNA
- Coverage ca. 5000X/mind. 100X UMI-Reads
- Nachweisgrenze 5 (3)%

**Genliste**

ATRX BRAF H3F3A H3F3B IDH1 IDH2 PTEN TP53 TERTPromotor

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	17 von 22

**Handbuch für Präanalytik VA-PA 4**
**Human Comprehensive Cancer Panel (Qiagen) V3**

- **20 - 80ng DNA**
- **277 Gene**      **Coverage ca. 3000 - 5000X /mind. 100X UMI-Reads**      **Nachweisgrenze 5 (3)%**

ABL1 ACVR1B AKT1 AKT2 AKT3 ALK AMER1 APC AR ARAF ARID1A ARID1B ARID2 ASXL1 ATM ATR ATRX AURKA  
 AURKB AURKC AXIN1 AXIN2 B2M BAP1 BCL2 BCL2L1 BCL6 BCOR BCORL1 BCR BIRC3 BLM BRAF BRCA1 BRCA2 BRIP1  
 BTK CALR CARD11 CBL CBLB CBLC CCND1 CCND3 CCNE1 CD274 CD79A CD79B CDC73 CDH1 CDK12 CDK4 CDK6  
 CDKN2A CDKN2B CDKN2C CEBPA CHEK1 CHEK2 CIC CREBBP CRLF2 CSF1R CSF3R CTCF CTNNA1 CTNNB1 CUX1 CXCR4  
 CYLD DAXX DDR2 DICER1 DNMT3A DOT1L EED EGFR EGLN1 EP300 EPAS1 EPHA3 EPHA5 ERBB2 ERBB3 ERBB4  
 ERG ESR1 ETV6 EXO1 EZH2 FAM175A FAM46C FANCA FANCC FANCD2 FANCE FANCF FANCG FAS FBXW7 FGF4 FGF6  
 FGFR1 FGFR2 FGFR3 FGFR4 FH FLCN FLT3 FLT4 FOXL2 FUBP1 GALNT12 GATA1 GATA2 GATA3 GEN1 GNA11 GNAQ GNAS  
 GREM1 GRIN2A HGFHIST1H3BHIST1H3B HIST1H3B HNF1A HOXB13 HRAS HSP90AA1 ID3 IDH1 IDH2 IGF1R IKZF1 IKZF3  
 INHBA IRF4 JAK1 JAK2 JAK3 KAT6A KDM5C KDM6A KDR KEAP1 KIT KMT2A KMT2B KMT2C KMT2D KRAS LRP1B MAP2K1  
 MAP2K2 MAP2K4 MAP3K14 MAPK1 MCL1 MDM2 MDM4 MED12 MEF2B MEN1 MITF MLH1 MPL MRE11A MSH2  
 MSH6 MTOR MUTYH MYCL MYC MYCN MYD88 NF1 NF2 NFE2L2 NFKBIA NKX2 NOTCH1 NOTCH2 NOTCH3 NPM1 NRAS  
 NSD1 NTRK1 NTRK2 NTRK3 PAK3 PALB2 PAX5 PBRM1 PDGFRA PDGFRB PHF6 PIK3CA PIK3R1 PIK3R2 PIM1 PLCG1 PMS1  
 PMS2 POLD1 POLE PPM1D PPP2R1A PRDM1 PRKAR1A PRKDC PRSS1 PTCH1 PTEN PTPN11 RAC1 RAD21 RAD50 RAD51  
 RAF1 RB1 RET RHEB RHOA RIT1 RNF43 ROS1 RUNX1 SDHB SETBP1 SETD2 SF3B1 SMAD2 SMAD4 SMARCA4 SMARCB1  
 SMC1A SMC3 SMO SOCS1 SOX2 SOX9 SPOP SRC SRSF2 STAG2 STAT3 STK11 SUFU SUZ12 TAL1 TCF3 TERT TET2 TGFBR2  
 TNFAIP3 TNFRSF14 TP53 TRAF3 TSC1 TSC2 TSHR U2AF1 U2AF2 VHL WHSC1 WT1 XPO1 XRCC2 XRCC3 ZNF217 ZRSR2

**Tumor Mutational Burden Panel (Qiagen)**

- **20 - 40ng DNA**
- **468 Gene**      **Coverage ca. 5000X /mind. 100X UMI-Reads**      **Nachweisgrenze 5 (3)%**

ABCB9, ABL1, ABL2, ACE2, ACVR1B, AKT1, AKT2, AKT3, ALK, ALPK2, AMER1, APC, AR, ARAF, ARID1A, ARID1B, ARID2, ARID5B, ASXL1, ASXL2, ATM, ATR, ATRX,  
 AURKA, AURKB, AXIN1, AXIN2, AXL, B2M, BAP1, BARD1, BCL2, BCL2L1, BCL6, BCOR, BCORL1, BLM, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRD4, BRIP1, BTK, C10orf54, CALR,  
 CANX, CARD11, CASP8, CBF3, CBL, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CD200, CD274, CD276, CD40, CD40LG, CD48, CD70, CD79A, CD79B, CD80, CD86, CDC27,  
 CDC73, CDH1, CDK12, CDK4, CDK6, CDK8, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CEBPA, CHD4, CHEK1, CHEK2, CIC, CNKSR1, COL5A1, CREBBP, CRKL,  
 CRLF2, CSF1R, CTCF, CTNNA1, CTNNB1, CTSB, CTSL, CTSS, CUL3, CUL4B, CUX1, CYLD, DAXX, DDR2, DDX3X, DICER1, DIS3, DMD, DNER, DNMT3A, DOT1L, EED,  
 EGFR, EP300, EPCAM, EPHA3, EPHA5, EPHA7, EPHB1, ERAP1, ERAP2, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERG, ERRF1, ESR1, ETV6,  
 EWSR1, EXO1, EZH2, FAM46C, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FAS, FAT1, FBXW7, FGF19, FGF3, FGF4, FGF6, FGF9, FGF11, FGF13, FGF15, FGF17,  
 FH, FIGF, FKBP9, FLCN, FLT1, FLT3, FLT4, FOXA1, FOXL2, FOXP1, FUBP1, GABRA6, GADD45A, GATA1, GATA2, GATA3, GATA4, GATA6, GLI1, GNA11, GNA13,  
 GNAQ, GNAS, GRIN2A, GSK3B, H3F3A, HERC1, HGF, HIST1H3B, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HMGB1, HMG1, HNF1A, HRAS, HSP90AA1, ICOSLG,  
 IGF1R, IGF2, IGF2R, IKZF1, IL7R, INPP4B, IRF4, IRF6, IRS2, ITGAV, ITGB3, JAK1, JAK2, JAK3, JUN, KAT6A, KDM5A, KDM5C, KDM6A,  
 KDR, KEAP1, KEL, KIT, KMT2A, KMT2C, KMT2D, KRAS, LGALS9, LGMN, LIG1, LIG3, LMO1, LNPEP, LPAR2, LRP1B, LZTR1, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K4, MAP3K1,  
 MCL1, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7, MDM2, MDM4, MED12, MEF2B, MEN1, MET, MICA, MICB, MITF, MLH1, MLH3, MORC4, MPL, MR1,  
 MRE11A, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5, MSH6, MTOR, MUC17, MUTYH, MYB, MYC, MYCL, MYCN, MYD88, MYOCD, NBN, NCOR1, NF1, NF2, NFE2L2, NFKBIA,  
 NKX2-1, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, NPEPPS, NPM1, NRAS, NRD1, NSD1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PALB2, PARK2, PARP1, PAX5, PBRM1, PCNA,  
 PDCD1LG2, PDGFRA, PDGFRB, PDIA3, PDK1, PHF6, PIK3C2B, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG, PIK3R1, PIK3R2, PIM1, PLCG2, PMS1, PMS2, POLB, POLD1, POLD2, POLD3,  
 POLD4, POLE, POLE4, PPP2R1A, PRDM1, PRKAR1A, PRKCG, PRKCI, PRKCZ, PRKDC, PSMA1, PSMA2, PSMA3, PSMA4, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMA8, PSMB1,  
 PSMB10, PSMB11, PSMB2, PSMB3, PSMB4, PSMB5, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMB9, PSMC1, PSMC2, PSMC3, PSMC4, PSMC5, PSMC6, PSMD1, PSMD10,  
 PSMD11, PSMD12, PSMD13, PSMD14, PSMD2, PSMD3, PSMD4, PSMD5, PSMD6, PSMD7, PSMD8, PSMD9, PSME1, PSME2, PSME3, PSME4, PSMF1, PSMG1,  
 PSMG2, PSMG3, PSMG4, PTCH1, PTEN, PTGS2, PTPN11, PTPRD, QKI, RAC1, RAD17, RAD18, RAD21, RAD50, RAD51, RAD51C, RAF1, RARA, RASA1, RB1, RBM10,  
 REL, RFC1, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5, RHEB, RHOA, RICTOR, RIT1, RNASEH2A, RNF43, ROS1, RPA1, RPA2, RPA3, RPA4, RPTOR, RUNX1, RUNX1T1, SDHA,  
 SDHB, SDHC, SDHD, SETD2, SF3B1, SIRT1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMC1A, SMC3, SMO, SOCS1, SOS1, SOX10, SOX17, SOX2, SOX9, SPEN,  
 SPOP, SRC, SSBP1, STAG2, STAT3, STK11, SUFU, SUZ12, SYK, TAP1, TAP2, TAPBP, TAPBP1, TBX3, TCF7L2, TCP1L1L2, TDG, TERC, TERT, TET2, TGFBR2, TNF,  
 TNFAIP3, TNFRSF14, TNFRSF9, TNFSF14, TNFSF4, TNFSF9, TNKS, TOP1, TP53, TP53BP1, TP73, TPP2, TREX1, TRRAP, TSC1, TSC2, TSHR, U2AF1, VEGFA,  
 VHL, VTCN1, WEE1, WT1, XPO1, XRCC5, ZFXH3, ZNF217

**Zusätzlich: TMB-Wert**

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
<b>apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf</b>	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	18 von 22

Handbuch für Präanalytik VA-PA 4

**HRD Panel (Qiagen)**

- 20 - 80ng DNA
- Coverage ca. 5000X/mind. 100X UMI-Reads
- Nachweisgrenze 5 (3)% (Varianten in den HRR-Genen)
- Zusätzlich: HRD-Status (pos./neg.) und HRD-Score (Kombination LOH, TOI, LST)

Genliste:

ATM    BARD1    BRCA1    BRCA2    BRIP1    CDK12  
 CHEK1    CHEK2    FANCA    FANCL    PALB2    PPP2R2A  
 RAD51B    RAD51C    RAD51D    RAD54L

**Archer™ FusionPlex™ Sarcoma Panel**

- 200ng RNA
- 26 Gene – ca. 30 Fusionen
- (Nachweisgrenze 5%)

Genliste:

ALK    CAMTA1    CCNB3    CIC    EPC1    EWSR1    FOXO1    FUS    GLI1  
 HMGA2    JAZF1    MEAF6    MKL2    NCOA2    NTRK3    PDGFB    PLAG1    ROS1  
 SS18    STAT6    TAF15    TCF12    TFE3    TFG    USP6    YWHAE

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	19 von 22

## Archer™ FusionPlex™ Sarcoma Expanded Panel

- 200ng RNA
- 55 Gene
- (Nachweisgrenze 5%)

### Genliste:

ALK	BCOR	BRAF	CAMTA1	CIC	CSF1	CTNNB1 (nur Mut.)	EGFR		
EPC1	ERG	ESR1	EWSR1	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FOS	FOSB	
FOXO1	FUS	GLI1	HMGA2	JAZF1	MDM2	MEAF6	MET	MGEA5	
MKL2	MYOD1 (nur Mut.)	NCOA1	NCOA2	NR4A3	NTRK1	NTRK2	NTRK3		
NUTM1	PAX3	PDGFB	PHF1	PLAG1	PRKCA	PRKCB	PRKCD	RAF1	
RET	ROS1	SS18	STAT6	TAF15	TCF12	TFE3	TFG	USP6	
VGLL2	YAP1	YWHAE							

### 5.12.2. Spezifische Hinweise für die FISH-Analysen

Auch für die FISH-Analysen gilt, dass die Einsendung von Blöcken bevorzugt wird. Ist es jedoch notwendig Schnitte einzuschicken so ist darauf zu achten, dass

- Genug Material / zu analysierende Zellen auf dem Schnitt vorhanden sind (mindestens 50 Tumorzellen pro Schnitt / Areal)
- Mindestens vier Schnitte mit einer Schnittdicke von 2µm eingesendet werden (das analysierte Material wird eingerahmt: Ein Schnitt für die erste HE-Färbung, zwei Schnitte für die Analyse und ein Schnitt für die zweite HE-Färbung)
- Die verwendeten Objektträger für eine FISH-Analyse tauglich sind (z. B. können Sie Objektträger der Firma Thermo Scientific, MenzelGläser, Superfrost PLUS (die Oberfläche sollte positiv geladen sein) oder ein vergleichbares Produkt verwenden).

### 5.12.3. Spezifische Hinweise für die Erregerdiagnostik

Die Erreger-Analysen erfolgen mittels PCR oder Nested-PCR und Agarose-Gelelektrophorese. Für den Nachweis von HPV-Isotypen in FFPE-Gewebe erfolgt eine zusätzliche Sequenzierung der PCR-Produkte. Die Nachweise sind z. T. sehr sensitiv (z. T. können 1-2 Kopien des analysierten Erreger-DNA-Bereichs nachgewiesen werden). Essentiell für den Nachweis der Erreger sind eine gute DNA-Qualität (s. o., „Störfaktoren“) und eine ausreichende Probenmenge (identisch mit den Angaben für Mutationsanalysen).

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	20 von 22

Handbuch für Präanalytik VA-PA 4

**5.12.4. Spezifische Hinweise für die Klonalitätsanalysen (Lymphomdiagnostik)**

Mittels der Klonalitätsanalysen kann zwischen dem Vorliegen eines Lymphoms in einer Gewebeprobe oder eines Gemisches an reaktiven Lymphozyten differenziert werden. Dazu werden die variablen Regionen des rearrangierten B-Zell- oder T-Zell-Rezeptors mittels PCR amplifiziert. Die so gewonnenen PCR-Amplifikate werden durch eine hochauflösende Kapillarelektrophorese (Beckman GeXP) analysiert. Auch hier gelten die bereits angesprochenen Aspekte zum Anteil der Tumorzellen (bzw. Anteil der verdächtigen Lymphozyten) in der Probe, zu den Materialmengen sowie zu den möglichen Störfaktoren. Die Nachweisgrenze liegt im Allgemeinen bei ca. 10-20 % (Hier: Anteil eines B- oder T-Zellklons an der gesamten B- oder T-Zellpopulation im Analyseareal).

**5.12.5. Spezifische Hinweise für die MSI-Analyse**

Die Mikrosatelliten-Analyse erfolgt mittels Multiplex-PCR und Kapillar-Elektrophorese (Beckman GeXP). Wie bei allen PCR-basierenden Nachweismethoden in der Molekularpathologie gelten auch hier die oben genannten Kriterien hinsichtlich der möglichen Störgrößen. Es handelt sich um einen sehr empfindlichen Assay. Für die Durchführung der MSI-Analyse wird nur Material von einem Schnitt benötigt (Empfehlung: 5µm mit einem Analyse-Areal von ca. 0,5 – 1 cm<sup>2</sup>). **Folgende Punkte sind wichtig:**

1. Bitte nur Blöcke einsenden (Material bleibt frischer)
2. Immer Normalgewebe als Vergleich mit einsenden (entweder auf demselben Block oder einen weiteren Block beilegen).

**5.13. Spezifische Hinweise für die HRD-Analytik**

Für die Durchführung der HRD-Analytik ergeben sich die gleichen Voraussetzungen wie für alle anderen NGS-basierten Analysen hinsichtlich der Menge und Güte des Gewebes, des Tumorzellgehalts sowie der Nachweisgrenze für die Varianten in den HRR-Genen. Es erfolgt jedoch darüber hinaus die Bestimmung und der Bericht über HRD-spezifische Alterationen im Tumorgewebe (loss-of-heterozygosity (LOH), Telomer-Imbalancen (TOI), große genomische Umlagerungen (LST)). Diese Analyse kann grundsätzlich bei allen Tumoren durchgeführt werden, momentan ist sie jedoch auf Endometrium- und Mammakarzinom beschränkt.

**5.14. Versand der Inspektionsberichte**

Inspektionsberichte (Befunde) können per Post, per FAX sowie elektronisch versendet werden.

*Versand per FAX*

Telefonisch angeforderte Berichte werden nur an bekannte Einsender übermittelt. Voraussetzungen sind zum einen die bereits erfolgte Freigabe des betroffenen Befundes durch den zuständigen Arzt, und zum anderen eine Bestätigung des Empfängers, dass das FAX-Gerät in einem nicht-öffentlichen, gesicherten Umfeld steht (dann kann der betreffende Befund durch das Sekretariat gefaxt werden).

*Elektronischer Versand*

An einige Einsender werden Befunde auf elektronischem Wege übermittelt (Klinikumsintern über das SAP-System). Die Übermittlung erfolgt über eine gesicherte DFÜ-Verbindung an einen definierten Empfänger. Es

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	21 von 22

Handbuch für Präanalytik VA-PA 4

erfolgt keine Übermittlung per Email. Unter den elektronisch versendeten Befunden befindet sich ein Vermerk, dass diese Befunde durch einen Facharzt freigegeben wurden und ohne Unterschrift gültig sind.

**Zudem gilt für die Übermittlung von Inspektionsberichten bzw. Prüfergebnissen:**

- Technische Mitarbeiter (MTA, Naturwissenschaftler) sind nicht befugt Analyseergebnisse zu übermitteln.
- Eine telefonische Übermittlung der Analyseergebnisse erfolgt in der Regel nur durch den befundenen Pathologen.
- Rückfragen bitte an das Sekretariat (0731 500 56320) stellen.

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	Prof.Dr. Möller, Peter	97130	001/24.03.2023	22 von 22