 Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie	Verfahrensanweisung
VA-PA 4.doc	Präanalytik

Handbuch für Präanalytik


Prüfungs- und Freigabe- Name:	Erstellt am:	Unterschrift:
protokoll		
Verfasser: Prof. Dr. R. Marienfeld	26.08.2021	
GEPRÜFT VON: Name:	Datum:	Unterschrift:
Dr. K. Mellert	26.08.2021	
QMB:	Leitung zur Prof. Dr. Peter Möller	26.08.2021
Freigabe:		

Ersetzt:	VA-PA 4 – Handbuch für Präanalytik	Version: 5	Datum: 13.03.2017
----------	---	-------------------	--------------------------

Inhalt


1. ZIEL UND ZWECK	3
2. ZUSTÄNDIGKEIT	3
3. GELTUNGSBEREICH	3
4. MITGELTENDE UNTERLAGEN	3
5. VERFAHRENSBESCHREIBUNG	4
5.1. GENERELLE HINWEISE ZUM VERSAND VON PRIMÄRPROBEN	4
5.2. HINWEISE FÜR DEN VERSAND VON BLUTPROBEN ZUR ISOLIERUNG VON cfDNA	4
5.3. HINWEISE FÜR DEN VERSAND VON PROBEN ZUR ENDO PREDICT®-TESTUNG.....	4
5.4. INFORMATIONEN ZUR EINSENDUNG VON PROBEN FÜR DIE LUNGEN-KREBS-ANALYSE IM NATIONALEN NETZWERK GENOMISCHE MEDIZIN (NNGM).....	4
5.5. INFORMATIONEN ZUR EINSENDUNG VON PROBEN FÜR DIE ANALYSE IM RAHMEN DES ZENTRUMS FÜR PERSONALISIERTE MEDIZIN (ZPM).....	5
5.6. INFORMATIONEN FÜR DIE EINSENDENDEN PATHOLOGEN.....	5
5.7. LEISTUNGSKATALOG	6
5.7.1. Mutationsanalysen.....	6
5.7.2. Erregernachweise.....	7
5.7.3. Klonalitätsanalysen bei Lymphomverdacht (BZR- und TZR-Rearrangement).....	8
5.7.4. FISH-Analysen.....	8
5.7.5. Sonstige Untersuchungen	11
5.8. PROBENANNAHME.....	12
5.9. NOTWENDIGE INFORMATIONEN AUF DEM EINSENDESCHIN UNTERSUCHUNGSSCHIN	12
5.10. HINWEISE ZUR FIXIERUNG DES GEWEBEMATERIALS	12
5.11. HINWEISE ZUR ENTKALKUNG VON KNOCHENPROBEN	13
5.12. ALLGEMEINE HINWEISE ZU DEN MOLEKULARPATHOLOGISCHEN ANALYSEN	14
5.12.1. Spezifische Hinweise für Mutationsanalysen	14
5.12.1.1. Spezifische Hinweise für die Next-Generation Sequenzierung (NGS)	15
5.12.2. Spezifische Hinweise für die FISH-Analysen	22
5.12.3. Spezifische Hinweise für die Erregerdiagnostik	22
5.12.4. Spezifische Hinweise für die Klonalitätsanalysen (Lymphomdiagnostik).....	22
5.12.5. Spezifische Hinweise für die MSI-Analyse	23
5.13. VERSAND DER INSPEKTIONSBERICHTE	23

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
Prof. Dr. R. Marienfeld	Dr. K. Mellert Prof. Dr. P. Möller	06/26.08.2021	1 von 24

	Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie	Verfahrensanweisung
VA-PA 4.doc	Präanalytik	

Auf Aktualität geprüft am:	Durch:
Verteiler:	
ORIGINAL: QMB	
Kopien: nach Verteilerschlüssel (s. FB-LD 1)	
Klinikumsinterne Klassifikation: Öffentlich	

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>Dr. K. Mellert</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	06/26.08.2021 2 von 24

 <p>Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie</p>	Verfahrensanweisung
VA-PA 4.doc	Präanalytik

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.

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, Molekularpathologie

4. Mitgeltende Unterlagen

VA-VD 2	Klonalitätsanalyse
VA-VD 3	Mutationsanalyse
VA-VD 4	FISH-Analysen
VA-VD 5	Erreger-Nachweise
VA-VD 6	Erregernachweise aus Myokardbiopsien
VA-VD 7	Gewebeschnitt-Herstellung und -Färbung
VA-PA 1	Probenannahme und Auftragseingabe

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>Dr. K. Mellert</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	3 von 24

	Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie	Verfahrensanweisung
VA-PA 4.doc	Präanalytik	

VA-PA 10	Befunderstellung und -versand
VA-PA 2	Unvollständiges Probenmaterial
VA-PA 3	Probenbehandlung allgemein

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 10ml in einem PAXgene Blood ccfDNA Tube (Qiagen, # 768115) oder ähnlich geeigneter spezifischer Röhren inkl. eines Überweisungsscheins sowie ggf. vorliegenden Ergebnissen vorheriger Mutationsstestungen (z.B. vorheriger EGFR-Mutationstestungen) zu. So ist z.B. eine Angaben 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.


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

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
Prof. Dr. R. Marienfeld	Dr. K. Mellert	Prof. Dr. P. Möller	06/26.08.2021
			4 von 24

 Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie	Verfahrensanweisung
VA-PA 4.doc	Präanalytik

Falls Sie Interesse an einer NSCLC-Analyse im nNGM-Verbund haben, kontaktieren Sie uns bitte.

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

Einschlusskriterien:

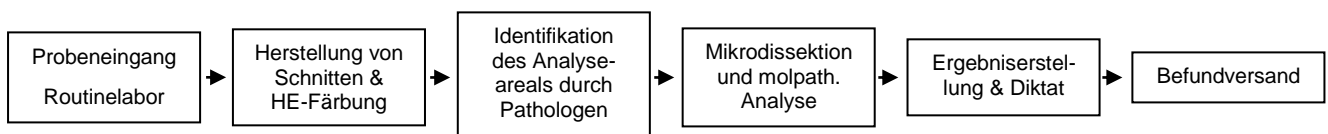
- Patientinnen und Patienten mit seltenen oder fortgeschrittenen Tumoren, oder mit Tumordispositionssyndromen
- Eine systemische Behandlung ist angezeigt
- Zugelassene Therapien stehen in dieser Indikation nicht mehr zur Verfügung
- Eine molekulargenetische Untersuchung soll erfolgen oder ist angedacht

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				
Mutationsanalytik	Prof. Dr. Ralf Marienfeld		Tel.: 0731 500 56306	ralf.marienfeld@uniklinik-
Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)		Version/Datum	Seite
Prof. Dr. R. Marienfeld	Dr. K. Mellert	Prof. Dr. P. Möller	06/26.08.2021	5 von 24

 Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie	Verfahrensanweisung
VA-PA 4.doc	Präanalytik

			ulm.de
Next-Generation Sequenzierung	Prof. Dr. Ralf Marienfeld	Tel.: 0731 500 56306	ralf.marienfeld@uniklinik-ulm.de
Liquid Biopsy	Prof. Dr. Ralf Marienfeld	Tel.: 0731 500 56306	ralf.marienfeld@uniklinik-ulm.de
EndoPredict	Prof. Dr. Ralf Marienfeld	Tel.: 0731 500 56306	ralf.marienfeld@uniklinik-ulm.de
Erregernachweis/ Klonalitätsanalytik	PD Dr. Frank Leithäuser	Tel.: 0731 500 56380	frank.leithaeuser@uniklinik-ulm.de
FISH-Analytik	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/Sanger-Sequenzierung/NGS	Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Kolon-Karzinom u.a.
EGFR-T790M	qPCR/NGS	Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Resistenztestung
C-KIT-Mutationsanalyse (Exon 9, 11, 13, 17)	PCR/Sanger-Sequenzierung/NGS	GIST / Mastozytose, Melanom
C-KIT-Mutationsanalyse (Exon 10)	PCR/Sanger-Sequenzierung	GIST / Mastozytose, Melanom
JAK2-Mutationsanalyse (Exon 12, nt 1849)	PCR/Pyro-Sequenzierung	Myeloproliferative Neoplasien
BRAF-Mutationsanalyse (Exon 15, Codon 600)	PCR/Pyro-Sequenzierung/NGS	Schilddrüsenkarzinom, Colonkarzinom, Melanom
K-RAS-Mutationsanalyse (Exon 2, 3 und 4)	PCR/Pyro-Sequenzierung/NGS	Kolorektale Karzinome, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom u.a.
PDGFRa-Mutationsanalyse (Exon 18)	PCR/Sanger-Sequenzierung/NGS	GIST / Mastozytose, Melanom
IDH1/2-Mutationsanalyse	PCR/Pyro-Sequenzierung/NGS	Astrozytome, Oligodendrogliome und Anaplastischen Gliome, Glioblastom
N-RAS-Mutationsanalyse (Codon Exon 2, 3 und 4)	PCR/Pyro-Sequenzierung	Malignome u.a.

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>Dr. K. Mellert</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	6 von 24


 Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie	Verfahrensanweisung
VA-PA 4.doc	Präanalytik

APC-Mutationsanalyse	PCR/Sanger-Sequenzierung	familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) u.a.
NPM1-Mutationsanalyse	PCR/Sanger-Sequenzierung	akute myeloische Leukämie
CTNNB1-Mutationsanalyse	PCR/Sanger-Sequenzierung	familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), aggressive Fibromatose, u.a.
C-MET-Mutationsanalyse	PCR/Sanger-Sequenzierung	Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Kolon-Karzinom u.a.
FGFR3-Mutationsanalyse	PCR/Sanger-Sequenzierung	u.a. Melanom
GNAS1-Mutationsanalyse	PCR/Sanger-Sequenzierung	z.B. V.a. fibröse Dysplasie
EZH2 (Exon 2-20)	PCR/Sanger-Sequenzierung	Lymphome
Her2neuV695	PCR/Pyro-Sequenzierung	Li Fraumeni Syndrom
PIK3CA-Mutationsanalyse	PCR/Sanger-Sequenzierung	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

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>Dr. K. Mellert</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	7 von 24

 Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie	Verfahrensanweisung	
	Präanalytik	

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
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 Leukämie, Multiples Myeloma u.a.
19q13/19p13	FFPE-Gewebematerial	Astrocytom, Oligodendrogliom Oligoastrocytom
1p36/1q25	FFPE-Gewebematerial	Astrocytom, Oligodendrogliom Oligoastrocytom

FISH mit Bruchanalyse-Sonden		
BCL2-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Follikuläres Lymphom, V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, DLBCL, Burkitt-Lymphom, etc.

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>Dr. K. Mellert</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	8 von 24

 Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie	Verfahrensanweisung
VA-PA 4.doc	Präanalytik

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	Va. a. Mantelzell-Lymphom, Lymphoproliferative Erkrankungen
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	Extraskelatale 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

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>Dr. K. Mellert</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	9 von 24




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 Hämangioendothiom
YWHAE-FAM22	FFPE-Gewebematerial	V. a. endometriales Stromasarcom, 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,

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
Prof. Dr. R. Marienfeld	Dr. K. Mellert	Prof. Dr. P. Möller	06/26.08.2021
			10 von 24

 Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie	Verfahrensanweisung
	Präanalytik

		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/PDGFR)	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
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
EndoPredict®	Multiplex-qPCR-Expressionsanalyse	Mamma-CA

Next-Generation-Sequenzierung/Panel-Sequenzierung (s. 5.10.1.1)

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.

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>Dr. K. Mellert</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	<i>06/26.08.2021</i>
			11 von 24

 Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie	Verfahrensanweisung
VA-PA 4.doc	Präanalytik

Neuro Panel	Multiplex-PCR/NGS	V.a. Gliome, Astrozytome, etc.
nNGM Panel	Multiplex-PCR/NGS	Nicht-kleinzellige Lungentumore
TP53	Multiplex-PCR/NGS	Solide Tumore
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

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
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
- Vertragsarzt Nummer, Krankenhaus, ggf. Station
- Absender (Adresse des einsendenden Arztes)
- Einsendedatum
- Untersuchungsmaterial/Klinische Diagnose
- Ergebnisse von histologischen Voruntersuchungen / Vorbefunde
- Klinische Fragestellung bzw. spezifischer Untersuchungsauftrag
- Anatomischer Entnahmestort 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:

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>Dr. K. Mellert</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	12 von 24

	Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie	Verfahrensanweisung
VA-PA 4.doc	Präanalytik	

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.

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:

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
Prof. Dr. R. Marienfeld	Dr. K. Mellert	Prof. Dr. P. Möller	06/26.08.2021 14 von 24

	Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie	Verfahrensanweisung
VA-PA 4.doc	Präanalytik	

- 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 μ m) mit ausreichendem Analyseareal benötigt.
- Größe des Analyseareals: Nach Möglichkeit 0,5 – 1 cm²
- 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 10ml in einem PAXgene Blood ccfDNA Tube (Qiagen, # 768115) oder ähnlich geeigneter spezifischer Röhrrchen.

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

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>Dr. K. Mellert</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	06/26.08.2021 15 von 24

	Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie	Verfahrensanweisung
VA-PA 4.doc	Präanalytik	

(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

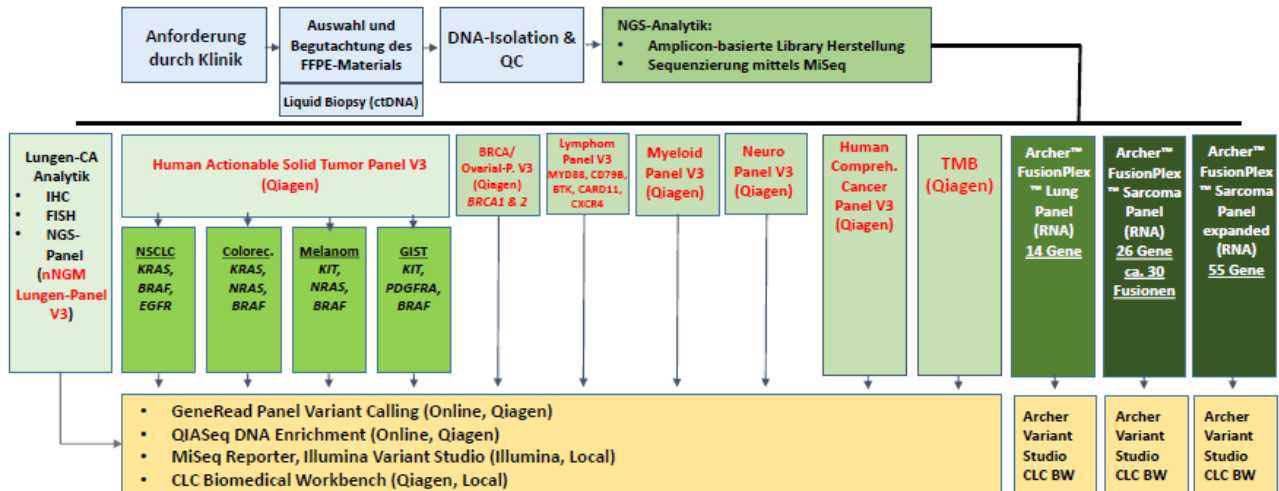
- In der Regel wird Material für 2 – 3 Schnitte (5 µm) mit ausreichendem Analyseareal benötigt.
- Bitte senden Sie uns nach Möglichkeit einen FFPE-Block
- Größe des Analyseareals: Nach Möglichkeit 0,5 – 1 cm²
- Empfohlener Tumoranteil im Analyseareal: ca. 50-80%.
- Die Zugänglichkeit der Gewebeprobe 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.

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>Dr. K. Mellert</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	16 von 24



Leistungsspektrum der auf NGS basierenden Mutations- und Fusionstranskript-Analytik



Human Actionable Solid Tumor Panel (V3 Panel)

- 20 - 40ng DNA
- Coverage ca. 5000X
- 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	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
Prof. Dr. R. Marienfeld	Dr. K. Mellert	Prof. Dr. P. Möller	06/26.08.2021
			17 von 24



nNGM-Lungen Panel (Qiagen, V3)_Version 2

- 20 - 40ng DNA
- 27 Gene
- ca. 21.000 Bp.
- Coverage ca. 5000X
- 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 - 40ng DNA
- ca. 19.000 Bp.
- Coverage ca. 5000X
- Nachweisgrenze 5%

Genliste:

BRCA1 BRCA2

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
Prof. Dr. R. Marienfeld	Dr. K. Mellert	Prof. Dr. P. Möller	06/26.08.2021
			18 von 24



Lymphoid Panel (Qiagen) V3

- 20 - 40ng DNA
- 5 Gene
- Coverage ca. 5000X
- Nachweisgrenze 5 (3)%

Genliste:

MYD88, CD79B, CARD11, BTK, CXCR4

Myeloid Panel (Qiagen) V3

- 20 - 40ng DNA
- 22 Gene
- 56800 Bp.
- Coverage ca. 5000X
- 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 - 40ng DNA
- 8 Gene
- Coverage ca. 5000X
- Nachweisgrenze 5 (3)%

Genliste

ATRX H3F3A H3F3B IDH1 IDH2 PTEN TP53 TERTPromotor

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
Prof. Dr. R. Marienfeld	Dr. K. Mellert	Prof. Dr. P. Möller	06/26.08.2021
			19 von 24



Human Comprehensive Cancer Panel (Qiagen) V3

- 20 - 40ng DNA
- 277 Gene Coverage ca. 3000 - 5000X 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 DNMT2 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 TGFB2 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 Nachweisgrenze 5 (3)%

ABC89, 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, CBF8, 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, FGFBP1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, 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, HMGN1, HNF1A, HRAS, HSP90AA1, ICOSLG, DIE, IDH1, IDH2, IFI30, IGF1R, IGF2, IGF2R, IKBKE, 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, 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, PRKCC, 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, RET, RFC1, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5, RHEB, RHOA, RICTOR, RITI, 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, TAPBPL, TBX3, TCF7L2, TCP11L2, TDG, TERC, TERT, TET2, TGFB2, TNF, TNFAIP3, TNFRSF14, TNFRSF9, TNFSF14, TNFSF18, TNFSF19, TNKS, TOP1, TP53, TP53BP1, TP73, TPP2, TREX1, TRRAP, TSC1, TSC2, TSHR, U2AF1, VEGFA, VHL, VTCN1, WEE1, WT1, XPO1, XRCC5, ZFH3, ZNF217

Zusätzlich: TMB-Wert

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
Prof. Dr. R. Marienfeld	Dr. K. Mellert	Prof. Dr. P. Möller	06/26.08.2021
			20 von 24



Archer™ FusionPlex™ Sarcoma Panel

- 200ng RNA
- 26 Gene – ca. 30 Fusionen

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


Archer™ FusionPlex™ Sarcoma Expanded Panel

- 200ng RNA
- 55 Gene

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

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
Prof. Dr. R. Marienfeld	Dr. K. Mellert	Prof. Dr. P. Möller	06/26.08.2021
			21 von 24

	Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie	Verfahrensanweisung
VA-PA 4.doc	Präanalytik	

Archer™ FusionPlex™ Lung Panel

- 200ng RNA
- 14 Gene

Genliste:

ALK	BRAF	EGFR	FGFR1	FRFR2	FGFR3	KRAS
MET	NRG1	NTRK1	NTRK2	NTRK3	RET	ROS1

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).

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

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
Prof. Dr. R. Marienfeld	Dr. K. Mellert	Prof. Dr. P. Möller	06/26.08.2021
			22 von 24

	Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie	Verfahrensanweisung
VA-PA 4.doc	Präanalytik	

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 cm²). **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. 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 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	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>Dr. K. Mellert</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	06/26.08.2021 23 von 24

	Universitätsklinikum Ulm Institut für Pathologie	Verfahrensanweisung
VA-PA 4.doc	Präanalytik	

Bearbeiter/in	Freigabe (QMB/Leitung)	Version/Datum	Seite
<i>Prof. Dr. R. Marienfeld</i>	<i>Dr. K. Mellert</i>	<i>Prof. Dr. P. Möller</i>	<i>06/26.08.2021</i> 24 von 24

Für die Übereinstimmung mit der im „QM-Arbeitsplatz“ hinterlegten Kopie trägt jeder Mitarbeiter selbst die Verantwortung.