

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 EndoPredict®- Testung	3
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)	4
5.6	Informationen für die einsendenden Pathologen	4
5.7	Leistungskatalog	5
5.7.1	Mutationsanalysen	5
5.7.2	Erregernachweis.....	6
5.7.3	Klonalitätsanalysen bei Lymphomverdacht (BZR- und TZR- Rearrangement)	6
5.7.4	FISH- Analysen	7
5.7.5	Sonstige Untersuchungen	8
5.8	Probenannahme	9
5.9	Notwendige Informationen auf dem Einsendeschein Untersuchungsschein.....	9
5.10	Hinweis zur Fixierung des Gewebematerials.....	10
5.11	Hinweise zur Entkalkung von Knochenproben.....	10
5.12	Allgemeine Hinweise zu den molekularpathologischen Analysen.....	10
5.12.1	Spezifische Hinweise für die Mutationsanalysen	11
5.12.1.1	Spezifische Hinweise für die Next- Generation- Sequenzierung (NGS)	12
5.12.2	Spezifische Hinweise für die FISH- Analysen	17
5.12.3	Spezifische Hinweise für die Erregerdiagnostik	17
5.12.4	Spezifische Hinweise für die Klonalitätsanalysen (Lymphomdiagnostik)	17
5.12.5	Spezifische Hinweise für die MSI- Analyse	18
5.12.6	Spezifische Hinweise für die HRD- Analytik.....	18
5.13	Versand der Inspektionsberichte	18

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	1 von 18

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 Versand der Befunde, Rückfragen, Schreiben der Befunde (**in Ausnahmefällen**)

Eingangslabor Probenannahme, -kontrolle

Pathologen Identifizierung der Analyseareale, Befunderstellung, medizinische Validation

MTA Durchführung der molekularpathologischen Analysen

3 Geltungsbereich

Institut für Pathologie

4 Mitgeltende Unterlagen

[Analysenauftrag FB-PA 1](#)

[Anforderungsbogen für Zusatzuntersuchungen FB-PA 2](#)

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

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

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

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

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

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	2 von 18

[Klonalitätsanalyse VA-VD 2](#)

[Leistungskatalog Molekularpathologie FB-EL 1](#)

[Unvollständiger Probeneingang Molekularpathologie FB-PA 10](#)

[Versandmaterialanforderung intern/ Taxi FB-PA 177](#)

[Versandmaterialanforderung Postversand FB-PA 176](#)

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 50ml),
- Einsendescheine,
- Versandmaterial
- und Versandmaterialanforderungsscheine

zur Verfügung gestellt werden. Bitte erfragen Sie nähere Informationen bei Frau Riede (0731/500-56359) oder fordern Sie eine Versandmaterial-Anforderung per Fax (0731/500-56396) an. Zusätzlich kann der Versandanforderungsschein auch von internen Einsendern über roXtra aufgerufen werden und von externen Einsendern über die Instituts- Homepage.

Die Proben können im Temperaturbereich von 4 bis 25 °C über mehrere Tage transportiert/gelagert werden.

Der Versand der Proben muss so erfolgen, dass eine Gefährdung Dritter ausgeschlossen ist und die Integrität der Proben sichergestellt ist.

Bei ungeeigneten oder beschädigten Proben wird der Einsender unverzüglich informiert.

Zu beachten ist, dass ein fehlerhaftes Versandprozedere (z.B. durch mangelhafte Fixation bzw. generell fehlerhafte Präanalytik) zu einem immer bestehenden Restrisiko in der Untersuchung führt, welches zu einer Einschränkung der diagnostischen Beurteilbarkeit führen kann, diese gelegentlich auch unmöglich macht.

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

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	3 von 18

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.

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

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.

Falls eine Whole-Exome-Sequenzierung (WES) angestrebt wird, brauchen wir für die Analyse neben einem geeigneten FFPE-Tumorgewebe auch 10ml EDTA-Blut für eine Kontrollsequenzierung sowie eine Einwilligung des/der Patienten/Patientin zur Keimbahndiagnostik. Idealerweise senden Sie die Anforderung, die ausgefüllte und vom Patienten unterschriebene Einwilligungserklärung sowie die Blutprobe gleichzeitig. Sollte eine dieser Komponenten fehlen, können wir mit der Analyse nicht beginnen.

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

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	4 von 18

durchgeführt (s. Abb. 1). Je nach gewünschter Untersuchung (Leistungskatalog, s. u.) sind aber unterschiedliche Details zu beachten, welche weiter unten kurz dargestellt sind.

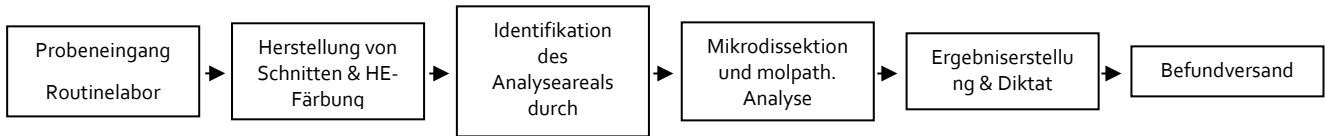


Abb. 1 Ablaufschema molekularpathologische Analysen

Ansprechpartner			
Mutationsanalytik	Prof. Dr. Ralf Marienfeld	Tel.: 0731 500 56306	ralf.marienfeld@uniklinik-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
nNGM-Analytik	Uwe Gerstenmaier	Tel.: 0731 500 56322	uwe.gerstenmaier@uniklinik-ulm.de
HRD-Analytik	Prof. Dr. Ralf Marienfeld	Tel.: 0731 500 56306	ralf.marienfeld@uniklinik-ulm.de
ZPM/MoFa	Prof. Dr. Ralf Marienfeld	Tel.: 0731 500 56306	ralf.marienfeld@uniklinik-ulm.de
Exom- Analytik	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

Wir bieten unseren Einsendern eine offene, interdisziplinäre Kooperation an. Die Institutsleitung und die zuständigen Mitarbeiter informieren und beraten Ärzte bei Bedarf umfassend in Bezug auf Indikationsstellung, Präanalytik und Befundinterpretation.

Die Beratung von Patienten erfolgt durch die einsendenden Ärzte der Pathologie.

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

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	5 von 18

Handbuch für Präanalytik VA-PA 4

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 / Mastrozytose, 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
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
EZH2 (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 Erregernachweis

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
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

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	6 von 18

Handbuch für Präanalytik VA-PA 4

TCRβ-Analyse

Multiplex PCR +Kapillarelektrophorese

V. a. T-Zell-Lymphom

5.7.4 FISH- Analysen

FISH mit Amplifikationssonden		
Nachweis	Methodik	Indikation
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
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		
Nachweis	Methodik	Indikation
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.
BCL10-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. MALT-Lymphom u.a.
CMYC-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, Multiples Myelom, Burkitt-Lymphom u.a.
DDIT3-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. myxoides Liposarkom
EWSR1-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Ewing-Sarkom
FUS-FISH	FFPE-Gewebematerial	Sarkome, AML, Histiozytome
IGH-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Non-Hodgkin-Lymphom (insb. Burkitt), Multiples Myelom
MAML2	FFPE-Gewebematerial	V. a. Mucoepidermoidtumor
MYB-FISH	FFPE-Gewebematerial	V.a. Chronische lymphocytische Leukämie (CLL), akute lymphoblastische Leukämie (ALL), B-cell small lymphocytic lymphoma (SLL), Plasmazell Myelom
NTRK 1	FFPE-Gewebematerial	Alle Tumoren
NTRK 2	FFPE-Gewebematerial	Alle Tumoren
NTRK 3	FFPE-Gewebematerial	Alle Tumoren
RET-FISH	FFPE-Gewebematerial	Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
ROS1-FISH	FFPE-Gewebematerial	Fortgeschrittenes Bronchialkarzinom, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	7 von 18

Handbuch für Präanalytik VA-PA 4

TFEB	FFPE-Gewebematerial	V. a. Nierenzellkarzinom
TFE3	FFPE-Gewebematerial	V. a. Nierenzellkarzinom
USP6-FISH	FFPE-Gewebematerial	V.a. Aneurysmatische Knochenzyste

FISH mit Translokations-Sonden

Nachweis	Methodik	Indikation
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
IGH/BCL2-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, DLBCL, Burkitt-Lymphom, etc.
MALT1/IGH-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, MALT-Lymphom
MALT1/BIRC3-FISH	FFPE-Gewebematerial	V. a. Non-Hodgkin-Lymphom, MALT-Lymphom
SS18/SSX1 Tricolor FISH	FFPE-Gewebematerial	V.a. Synovialsarkom

Besondere FISH-Analysen

X, Y Chromos. FISH	FFPE-Gewebematerial	Identitätsbestimmung i. Gewebeproben
--------------------	---------------------	--------------------------------------

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
Expressionsanalysen		
EndoPredict®	Multiplex-qPCR-Expressionsanalyse	Mamma-CA
Next-Generation-Sequenzierung/Panel-Sequenzierung (s. 5.12.1.1)		
BRCA 1/2 Mutationsanalyse	Multiplex-PCR/NGS	Ovarialkarzinom Eileiterkarzinom Primäres Peritonealkarzinom
Human Actionable Solid Tumor Panel	Multiplex-PCR/NGS	Solide Tumore

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	8 von 18

Handbuch für Präanalytik VA-PA 4

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)
BoR Panel	Multiplex-PCR/NGS	Indikationsfrei
WES	Multiplex-PCR/NGS	Indikationsfrei
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
Hybridisierungsanalytik		
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
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)

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	9 von 18

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

5.10 Hinweis 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 Knochengewebe 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.

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	10 von 18

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 die 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:

- ≥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.

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	11 von 18

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 µm) 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 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-, ein NextSeq- sowie ein NovaSeq-Gerät** (Illumina) zur Verfügung. Momentan verwenden wir für die Tumordiagnostik eine Amplicon-basierte Re-Sequencing Technologie von QIAGEN für die NGS-basierte Mutations-Analytik **sowie eine Hybridisierungs-basierte Technologie der Firma TWIST für die WES-Analytik** und FusionPlex-Panels der Firma Archer für den Nachweis von Fusionstranskripten. Die **Qiagen- sowie die Archer-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.

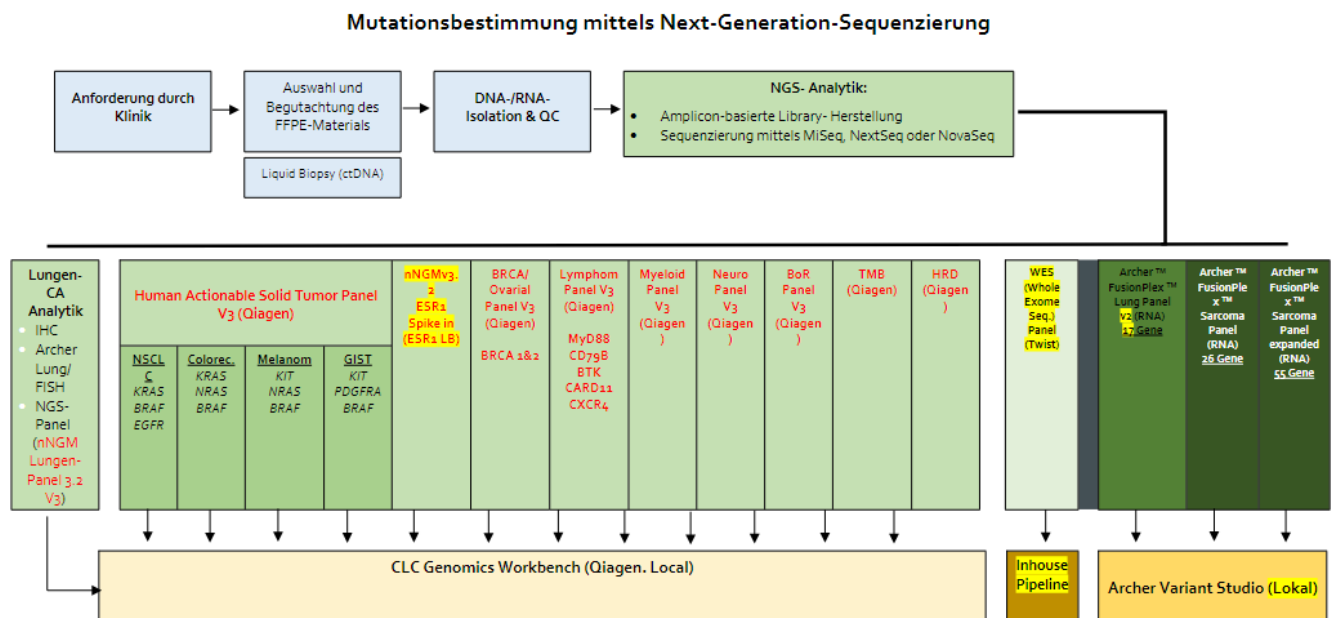
Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	12 von 18

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.

Leistungsspektrum der auf NGS basierenden Mutations- und Fusionstranskript-Analytik



Human Actionable Solid Tumor Panel (V3 Panel)

- 20-80 ng 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	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	13 von 18

nNGM-Lungen Panel (Qiagen V3) Version 2

- 20-80 ng 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)

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

Genliste:

BRCA1 BRCA2

Lymphom Panel (Qiagen) V3

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

Genliste:

MYD88 CD79B CARD11 BTK CXCR4

Myeloid Panel (Qiagen) V3

- 20-80 ng 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

- 20-80 ng DNA

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	14 von 18

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

Genliste:

ATRX	BRAF	H3F3A	H3F3B	IDH1	IDH2	PTEN
TP53	TERTPromotor					

Best-of-Rest BoR (Qiagen) V3

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

Genliste:

APC	CTNNB1	GNAS	NPM1	POLE
-----	--------	------	------	------

Tumor Mutational Burden Panel (Qiagen) V3

- 20-80 ng 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, CBF, 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, ERFF1, 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, FDX1, 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, IGF1, 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, 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,

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	15 von 18

RAD18, RAD21, RAD50, RAD51, RAD51C, RAF1, RARA, RASA1, RB1, RBM10, REL, RET, 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, TAPBPL, TBX3, TCF7L2, TCP11L2, TDG, TERC, TERT, TET2, TGFBR2, TNF, TNFAIP3, TNFRSF14, TNFRSF9, TNFSF14, TNFSF18, TNFSF4, TNFSF9, TNKS, TOP1, TP53, TP53BP1, TP73, TPP2, TREX1, TRRAP, TSC1, TSC2, TSHR, U2AF1, VEGFA, VHL, VTCN1, WEE1, WT1, XPO1, XRCC5, ZFH3, ZNF217

Zusätzlich: TMB-Wert

HRD Panel (Qiagen) V3

- 20-80 ng DNA
- Coverage ca. 5000X/mind. 100X UMI-Reads
- Nachweisgrenze 5 (3)%
- 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™ Lung Panel v3.2

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

Genliste:

ALK	BRAF	EGFR	ERBB2	FGFR1	FRFR2	FGFR3
KRAS	MET	NRG1	NTRK1	NTRK2	NTRK3	NUTM1
PIK3CA	RET	ROS1				

Archer™ FusionPlex™ Sarcoma Panel

- 200 ng 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		

Archer™ FusionPlex™ Sarcoma Expanded Panel

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

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	16 von 18

Genliste:

ALK Mut.)	BCOR EGFR	BRAF EPC1	CAMTA1 ERG	CIC ESR1	CSF1 EWSR1	CTNNB1 (nur 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						

WES (Whole Exome Sequencing) Panel

- 200ng DNA
- Coverage ca. 100X für Tumor, 30X für Blutprobe
- Nachweisgrenze 5-10%
- Zusätzlich Komplexe Marker (u.a. TMB, HRD, MSI)

Genliste:
Exone komplett
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 Schrittdicke von 2µm eingeschendet 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 Tumorzellen (bzw. Anteil der verdächtigen Lymphozyten) in

Bearbeiter*in	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	17 von 18

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).

5.12.6 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.

5.13 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	Freigeber*in	ID	Revision	Seite
apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	apl.Prof.Dr. Marienfeld, Ralf	97130	002/11.07.2024	18 von 18