

Pathologie 2018 · 39:178–180
<https://doi.org/10.1007/s00292-018-0423-0>
Online publiziert: 2. März 2018
© Springer Medizin Verlag GmbH, ein Teil von Springer Nature 2018

Herausgeber
R. Knüchel-Clarke, Aachen
F. Fend, Tübingen



W. Dietmaier¹ · M. Hummel²

¹ Institut für Pathologie, Universität Regensburg, Regensburg, Deutschland

² Institut für Pathologie, Charité Campus Mitte, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland

Qualitätssicherung in der Molekularpathologie

Der Qualitätssicherung kommt in der Molekularpathologie eine wesentliche Bedeutung zu. Auch im Zusammenhang mit den Anforderungen des Medizinproduktgesetzes, das die bundeseinheitliche Umsetzung der EU-Richtlinien 90/385 EWG, 93/42 EWG und 98/79 EWG für das Inverkehrbringen, die Zulassung und die Kontrolle von Medizinprodukten, also auch In-vitro-Diagnostika (IVD) regelt, muss dem Thema Qualitätssicherung entsprechend Rechnung getragen werden.

Bei der Verwendung von Diagnostika mit CE(Communauté Européenne)-Kennzeichnung ist darauf zu achten, dass der gesamte Untersuchungsprozess einschließlich Präanalytik CE-konform nach Herstellervorgaben durchgeführt wird und dass vor der Verwendung in der Routinediagnostik die angegebenen Leistungsdaten überprüft und verifiziert werden. Eine gesonderte Validierung ist allerdings nicht erforderlich, da diese bereits vom Hersteller durchgeführt wurde.

Wichtig bei Verwendung von Diagnostikverfahren ohne CE-Kennzeichnung: Validierung

Einen besonders wichtigen Stellenwert hat die Qualitätssicherung dann, wenn in der Diagnostik Reagenzien bzw. Assays verwendet werden, die selbst (im eigenen Haus) hergestellt sind (inhouse oder „laboratory developed tests“), nicht an Dritte weitergegeben werden und kein Konformitätsbewertungsverfahren durchlaufen, das mit der CE-Kennzeichnung abschließt. Gerade in diesem sehr häufigen Fall ist sicherzustellen,

dass diese Diagnostika die gleichen Anforderungen an Sicherheit, Qualität und Leistung wie alle Medizinprodukte erfüllen. Eine Validierung dieser diagnostischen Untersuchungsverfahren ist dabei eine Grundvoraussetzung. Dafür stellt ein Qualitätsmanagement naturgemäß eine sehr hilfreiche Grundstruktur dar. Die Deutsche Akkreditierungsstelle (DAkkS) nennt in ihrem Leitfaden 71 SD 4 037 für die Validierung von Untersuchungsverfahren zur Qualitätssicherung wichtige Aspekte, die nicht nur für die Akkreditierung der molekularen Pathologie direkt relevant sind, sondern generell für die Gewährleistung und eine nachweisbare Dokumentation einer qualitätsgesicherten Arbeit in der Molekularpathologie von großem Nutzen sind (https://www.dakks.de/sites/default/files/dokumente/71_sd_4_037_leitfaden_validierung_molpath_20161004_v1.1.pdf). Die Validierung ist grundsätzlich zu unterscheiden von der Etablierung, die lediglich die Austestung und Optimierung der technischen Parameter eines neuen Verfahrens beinhalten (z. B. PCR-Bedingungen).

Bei der Validierung molekularpathologischer Untersuchungsverfahren ist zu beachten, dass hier ein stufenweises Vorgehen vorliegt, das neben der analytischen Komponente eine Inspektions-tätigkeit und eine sachverständige Beurteilung einschließt. Eine Akkreditierung erfolgt hier im Fachbereich Pathologie nach der Norm DIN EN ISO/IEC 17020, wobei für die analytischen Schritte sinngemäß die Anforderungen der DIN EN ISO/IEC 17025 (Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien) sowie der DIN EN ISO 15189 (Anforderungen

an die Qualität und Kompetenz medizinischer Laboratorien) gelten. Dazu müssen alle validierten Untersuchungsverfahren nachweislich reproduzierbar richtige Ergebnisse liefern.

Ermittlung der Kenndaten Sensitivität, Spezifität, Präzision und Richtigkeit

Dies bedeutet, dass selbst entwickelte oder abgewandelte CE-gekennzeichnete Untersuchungsverfahren zur Validierung genau beschrieben und hinsichtlich ihrer Kenndaten Sensitivität, Spezifität, Präzision und Richtigkeit überprüft werden müssen. Bei der Beschreibung werden u. a. die Methode und, beispielsweise bei Mutationsanalysen, die genaue untersuchte Zielregion (z. B. Exon, Codon, genomische Koordinaten der amplifizierten Region, verwendetes Referenzgenom etc.) angegeben. Daneben wird auch beschrieben, welches Probenmaterial (z. B. formalinfixiertes paraffineingebettetes [FFPE] Gewebe, Frischgewebe, Blut, Plasma etc.) geeignet ist und welche präanalytischen Prozesse auf welche Weise durchgeführt werden. Dazu zählen z. B. Schritte wie die Probenvorbereitung einschließlich Fixierung und – bei Blut oder anderen flüssigen Proben – Zentrifugation und Ähnliches. Daneben müssen Bedingungen für eine eventuell erforderlichen Makro-/Mikrodissektion sowie die Umgangsweise mit grenzwertigen Proben (geringer Tumorzellanteil, unzureichende Materialmengen, mangelnde DNA-Qualität etc.) beschrieben werden. Auch die Prozesse der Materialverarbeitung für die molekularen Analysen, wie z. B. die DNA/RNA-Ge-

winnung, und deren Qualitäts- und Mengenbestimmung sind Bestandteile der Betrachtung. Ebenso wird beschrieben, wie das Untersuchungsergebnis ausgewertet und beurteilt wird, ob es Referenz- oder Sollbereiche gibt und wie mit kritischen Ergebnissen, z. B. Befunde in grenzwertigen Bereichen, verfahren wird. Bei der Beschreibung der Befundinterpretation sollte erkenntlich sein, dass wichtige Standards beachtet werden. Ein Beispiel dafür ist die Angabe von Varianten und Mutationen nach HGVS (Human Genome Variation Society; <http://varnomen.hgvs.org/>) bei der Mutationsanalyse mittels Sequenzierung.

Neben dieser grundlegenden Beschreibung des Untersuchungsverfahrens muss natürlich auch die praktische Leistungsfähigkeit überprüft und die Eignung für den vorgesehenen Zweck sichergestellt werden. Dazu ist es erforderlich, die jeweiligen Kenngrößen Trennschärfe und Genauigkeit zu ermitteln. Durch die Untersuchung mehrerer

Proben, die eine ausreichende Anzahl von positiven (z. B. spezifisch mutierten) und negativen (z. B. nichtmutierten) Fällen enthalten, lässt sich feststellen, wie sensitiv und spezifisch die Untersuchungsmethode ist. Zur Validierung sollte in einer angemessenen, möglichst großen Anzahl von Proben die Testung durchgeführt werden. In der Praxis hängt die „angemessene Anzahl“ naturgemäß von der Verfügbarkeit, Zugänglichkeit und der Prävalenz (z. B. einer bestimmten nachzuweisenden Mutation) ab. Für eine Validierung, z. B. einer BRAF-V600-Mutationsanalyse, beim Melanom können sicherlich problemlos jeweils mind. 10–20 bekannt positive (mutierte) und negative (Wildtyp-)Proben getestet werden. Positive oder negative Proben werden dabei so verstanden, dass sie mit einem anderen, bereits validierten Verfahren oder in einem anderen (Referenz-)Institut vorgetestet wurden. Aus den Ergebnissen lässt sich die Kenngröße „Trennschärfe“ (Sensitivität und Spezifität) ermitteln. Die Sensitivität

wird mittels der Formel „Anzahl richtig positiv/(Anzahl richtig positiv + Anzahl falsch negativ)“ und die Spezifität mit der Formel „Anzahl richtig negativ/(Anzahl richtig negativ + Anzahl falsch positiv)“ berechnet. Von dieser analytischen Sensitivität ist die Nachweisgrenze („limit of detection“, LOD) zu unterscheiden, die angibt, welche Menge oder welcher Anteil an Ziel-DNA (Targets) in einer Probe zur sicheren Detektion vorhanden sein muss. Die LOD kann, falls erforderlich, z. B. durch Verdünnungsreihen aus Wildtyp-DNA und mutierter DNA ermittelt werden.

Eine weitere Kenngröße ist die Genauigkeit (Präzision und Richtigkeit). Die Präzision beschreibt das Ausmaß der Streuung unabhängiger Analyseergebnisse an derselben Probe. Bei qualitativen Analysen bezieht sich die Präzision auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Wiederhol- und Vergleichspräzision). Dabei wird die Intraassay- von der Interassaypräzision unterschieden. Für die Intraassaypräzision kann z. B. min-

Hier steht eine Anzeige.

 Springer

destens je eine bekannt positive und eine bekannt negative Probe in jeweils Dreifachbestimmung in ein und demselben Untersuchungsansatz untersucht werden. Zur Bestimmung der Interassay-präzision können z. B. die Proben an zwei weiteren Tagen (und ggf. von einer anderen Person) in einer Einfachbestimmung untersucht werden.

Überprüfung der Richtigkeit eines diagnostischen Verfahrens

Ein weiterer wesentlicher Kernpunkt bei der Validierung eigener und abgewandelter CE-gekennzeichneter Untersuchungsverfahren ist die Überprüfung der Richtigkeit, also die Erkennung und Vermeidung systematischer Fehler. Hier werden die Ergebnisse des zu validierenden Untersuchungsverfahrens mit denen eines bereits validierten Referenzkollektivs verglichen. Für die Überprüfung der Richtigkeit ist z. B. die Teilnahme an Ringversuchen geeignet und zu empfehlen. Ringversuche werden von verschiedenen, auch internationalen Einrichtungen angeboten. Auf nationaler Ebene steht bei der Qualitätsinitiative Pathologie (QuIP GmbH) ein breites Spektrum von Ringversuchen zur Verfügung, das u. a. alle wichtigen und aktuellen molekularpathologischen Marker und Companion-diagnostics-Marker beinhaltet. Die DAkKS nennt als empfohlene Häufigkeit für die Teilnahme an Ringversuchen zwei Jahre. In Fällen, in denen kein geeigneter Ringversuch zur Verfügung steht, ist zur Überprüfung der Richtigkeit auch die Testung von externen und vorgetesteten Proben aus anderen Instituten in einer angemessenen Anzahl möglich.

Schließlich sind alle Untersuchungen und deren Ergebnisse, die zur Ermittlung der Kenndaten und zur Freigabe des Verfahrens für diagnostische Anwendungen herangezogen wurden, zusammen mit dem Freigabevermerk zu dokumentieren und bis mindestens fünf Jahre nach der letzten Anwendung des betreffenden Verfahrens aufzubewahren.

Weitere wichtige Faktoren für die Qualitätssicherung

Neben der Validierung bzw. Verifizierung von molekularpathologischen Untersuchungsverfahren spielen natürlich auch weitere Faktoren eine wichtige Rolle für die Qualitätssicherung. Ganz essenziell ist z. B. die Vermeidung von Kontaminationen während der Präanalytik und der eigentlichen Untersuchung. Hier ist darauf zu achten, dass es durch geeignete Maßnahmen nicht zur Verschleppung von Probenanteilen, z. B. während der Probenfixierung, Paraffineinbettung oder beim Anfertigen von Schnittpräparaten am Mikrotom, kommt. Alle Mitarbeiter sollten darüber gut informiert und geschult sein. In der PCR-Analytik sollten zur Vermeidung von PCR-Kontaminationen getrennte Prä- und Post-PCR-Bereiche vorhanden sein. Daneben sollten *Standard Operation Procedures* (SOP) vorliegen, die alle Abläufe klar beschreiben und regeln. Dies betrifft alle Prozesse sowohl in der Präanalytik, beginnend mit der Probenannahme, in der eigentlichen Analyse bis zum Bericht des Untersuchungsergebnisses und in der Integration in einen abschließenden (molekularpathologischen) Gesamtbefund. Als Nachweis eines extern kontrollierten und dokumentierten Qualitätssicherungssystems ist die Akkreditierung im Fachbereich Pathologie nach der Norm DIN EN ISO/IEC 17020, insbesondere auch im Hinblick auf die Anforderungen des Medizinproduktegesetzes, zu empfehlen.

Qualitätssicherung und molekularpathologische Befundung

Eine zunehmende Bedeutung kommt in Zukunft auch den weitergehenden Befundinterpretationen hinsichtlich ihrer klinisch-therapeutischen Relevanz zu. Insbesondere bei den molekularen Veränderungen mit Therapieempfehlungen im Rahmen von zugelassenen Verfahren („companion diagnostics“) müssen nach Vorgabe des *Einheitlichen Bewertungsmaßstabs* (EBM, 19.4.4) die therapeutischen Substanz(-gruppen) genannt werden, die klinisch zur An-

wendung kommen sollten. Diese Ebene der Befundinterpretation erfordert auch für die Qualitätssicherung neue Ansätze. Daher sollte die klinische Interpretation von molekularen Befunden Bestandteil im Rahmen der QuiP-Ringversuche werden.

Fazit für die Praxis

Für die Qualitätssicherung in der Molekularpathologie stellt die Validierung von Untersuchungsverfahren einen wesentlichen Punkt dar, der durch entsprechende Nachweise der jeweiligen Kenndaten dokumentiert sein muss. Der von der Akkreditierungsstelle (DAkKS) formulierte Leitfaden 71 SD 4 037 für die Validierung von Untersuchungsverfahren zur Qualitätssicherung enthält dazu wichtige Hinweise und Tipps für die praktische Umsetzung. Eine Akkreditierung nach der Norm DIN EN ISO/IEC 17020 ist für die Qualitätssicherung in der molekularpathologischen Diagnostik allgemein, aber insbesondere auch im Hinblick auf die Anforderungen des Medizinproduktegesetzes im Bereich der molekularen In-vitro-Diagnostik empfehlenswert.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. W. Dietmaier
Institut für Pathologie, Universität Regensburg
Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053 Regensburg, Deutschland
wolfgang.dietmaier@klinik.uni-regensburg.de

Prof. Dr. M. Hummel
Institut für Pathologie, Charité Campus Mitte,
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Virchowweg 16/17a, 10117 Berlin, Deutschland
michael.hummel@charite.de

Interessenkonflikt. W. Dietmaier und M. Hummel geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.