

Ringversuchsbericht H3F3A 2020

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|---|
| 1. Kontaktdaten und Unteraufträge..... | 3 |
| 2. Interner Ringversuch..... | 3 |
| 2.1 Methodenauswahl der Lead- und Panelinstitute..... | 3 |
| 3. Offener Ringversuch..... | 4 |
| 3.1 Zusammensetzung und Sollwerte des Probenmaterials..... | 4 |
| 3.2 Bewertungskriterien..... | 4 |
| 3.3 Ergebnisse..... | 5 |
| 3.4 Methodische Angaben der Teilnehmer..... | 6 |
| 3.5 Ungewöhnliche Vorkommnisse..... | 8 |
| 4. Schlussfolgerung..... | 9 |

1. Kontaktdaten und Unteraufträge

Der Ringversuch H3F3A 2020 wurde durchgeführt von der:

Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie QuIP GmbH
 Reinhardtstr. 1
 10117 Berlin
 Telefon: +49 30 92107170
 E-Mail: office@quip.eu

Die wissenschaftliche Leitung des H3F3A 2020 Ringversuches übernahm Herr Prof. Dr. med. Guido Reifenberger vom Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf:

Institut für Neuropathologie
 Universitätsklinikum Düsseldorf
 Moorenstr. 5
 40225 Düsseldorf

Zudem übernahm das Lead-Panelinstitut folgende Arbeiten im Unterauftrag: Materialauswahl und Testsetzusammenstellung (inkl. Schneiden, Kontrolltestung und den internen Ringversuch).

2. Interner Ringversuch

Zur Kontrollprüfung wurden den Panelinstituten zehn Proben zur Gegentestung zugesendet. Der interne Ringversuch fand im Zeitraum vom Juni bis Juli 2020 statt. In den offenen Ringversuch gingen nur Proben, die von allen drei Instituten gleich bewertet wurden.

Die Gegentestung (interner Ringversuch) der Probensets übernahmen folgende Institute:

Prof. Dr. med. Markus J. Riemenschneider, Neuropathologie Universitätsklinikum Regensburg
 Prof. Dr. med. Till Acker, Neuropathologie Universitätsklinikum Gießen

2.1 Methodenauswahl der Lead- und Panelinstitute

Die verwendeten Methoden des Lead- und der Panelinstitute sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Methodenauswahl der Lead- und Panelinstitute

| | Düsseldorf | Panel | Panel |
|---------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Methode | Sanger Sequenzierung | Sanger Sequenzierung | Sanger Sequenzierung |

Alle drei Institute haben die Sanger Sequenzierung eingesetzt und kamen zu übereinstimmenden Ergebnissen. Die von dem Lead- und den Panelinstituten ermittelten *H3F3A*-Mutationen der Fälle sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Ergebnisse der Mutationsanalyse der untersuchten Fälle des Lead- und der Panelinstitute

| | Lead | Gießen | Regensburg |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Fall 1 | Wildtyp | Wildtyp | Wildtyp |
| Fall 2 | Mutation (H3.3-K27M) | Mutation (H3.3-K27M) | Mutation (H3.3-K27M) |
| Fall 3 | Mutation (H3.3-K27M) | Mutation (H3.3-K27M) | Mutation (H3.3-K27M) |
| Fall 4 | Wildtyp | Wildtyp | Wildtyp |
| Fall 5 | Mutation (H3.3-K27M) | Mutation (H3.3-K27M) | Mutation (H3.3-K27M) |
| Fall 6 | Mutation (H3.3-G34R) | Mutation (H3.3-G34R) | Mutation (H3.3-G34R) |
| Fall 7 | Mutation (H3.3-G34V) | Mutation (H3.3-G34V) | Mutation (H3.3-G34V) |
| Fall 8 | Wildtyp | Wildtyp | Wildtyp |
| Fall 9 | Wildtyp | Wildtyp | Wildtyp |
| Fall 10 | Mutation (H3.3-G34R) | Mutation (H3.3-G34R) | Mutation (H3.3-G34R) |

3. Offener Ringversuch

Den Teilnehmern wurden zehn Fälle mit jeweils fünf ungefärbten Objektträgern mit Gewebeschnitten im Zeitraum vom 12. bis 16.10.2020 zugesandt.

3.1 Zusammensetzung und Sollwerte des Probenmaterials

Die Zusammensetzung des Materials sowie die Sollwerte der Probensets sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3: Zusammensetzung und Sollwerte des Probenmaterials

| | H3.3-Mutationsstatus | H3.3-Mutationsart |
|----------------|-----------------------------|--------------------------|
| Fall 1 | Wildtyp | - |
| Fall 2 | Mutation | K27M |
| Fall 3 | Mutation | K27M |
| Fall 4 | Wildtyp | - |
| Fall 5 | Mutation | K27M |
| Fall 6 | Mutation | G34R |
| Fall 7 | Mutation | G34V |
| Fall 8 | Wildtyp | - |
| Fall 9 | Wildtyp | - |
| Fall 10 | Mutation | G34R |

3.2 Bewertungskriterien

Die Teilnehmer sollten das Gewebematerial mittels molekularpathologischer oder immunhistochemischer Methoden auf das Vorhandensein einer H3.3-K27M-, H3.3-G34R- oder H3.3-G34V-Mutation im *H3F3A*-Gen überprüfen. Für jede richtige Antwort wurden zwei Punkte vergeben. Bei zehn Fällen ergab sich daraus eine Gesamtpunktzahl von 20 Punkten. Für eine erfolgreiche Teilnahme am Ringversuch waren mindestens 19 Punkte erforderlich. Konnte ein

Nachweis aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden, so wurde dafür ein Punkt vergeben. Diese Möglichkeit konnte allerdings nur einmal verwendet werden, außer in begründeten Ausnahmefällen.

3.3 Ergebnisse

Für den offenen Ringversuch H3F3A-2020 haben sich innerhalb der vorgegebenen Frist 17 Teilnehmer angemeldet. Nach Versand der Probensets hatten die Teilnehmer zehn Werkzeuge Zeit, die Ergebnisse ihrer Untersuchungen mitzuteilen.

Die Teilnehmer sollten aus den Paraffinschnitten zunächst die DNA isolieren und anschließend sollte der molekularpathologische Nachweis einer H3.3-K27M-, H3.3-G34R- oder H3.3-G34V-Mutation im *H3F3A*-Gen erfolgen. Der Mutationsstatus konnte auch immunhistochemisch mittels kommerziell erhältlicher Mutations-spezifischer Antikörper erhoben werden. Die Methoden konnten von den teilnehmenden Instituten frei gewählt werden. Es haben alle Teilnehmer ihre Ergebnisse eingereicht. Der Vergleich der zehn Fälle mit den Ergebnissen der Panelinstitute führte zu folgendem Ergebnis (die Sollwerte befinden sich in Tabelle 3):

Erfolgreiche Teilnahme insgesamt: 15 von 17 (88 %).

In Tabelle 4 sind die Ergebniseinreichungen der Teilnehmer pro Fall dargestellt.

Tabelle 4: Einreichungen der Teilnehmer des Ringversuchs H3F3A 2020

| | Fall 1 | Fall 2 | Fall 3 | Fall 4 | Fall 5 | Fall 6 | Fall 7 | Fall 8 | Fall 9 | Fall 10 |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| H3.3-K27M-Mutation positiv | 0 | 17 | 17 | 0 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| H3.3-G34R/V-Mutation positiv | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 16 | 0 | 0 | 14 |
| Negativ (keine H3.3-K27M- oder H3.3-G34R/V-Mutation) | 17 | 0 | 0 | 17 | 0 | 1 | 1 | 16 | 17 | 1 |
| Nicht auswertbar | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 |

Die Zahlen in der Tabelle entsprechen der Anzahl der Teilnehmer, welche die entsprechende Antwort gewählt haben. Die richtige Antwort ist in fetter Schrift angegeben.

3.4 Methodische Angaben der Teilnehmer

53% der Teilnehmer haben nur eine molekularbiologische Methode oder die Immunhistochemie zur Bestimmung des Mutationsstatus der Fälle eingesetzt, während 47% eine Kombination aus einer molekularbiologischen Methode und der Immunhistochemie bzw. zweier molekularbiologischer Methoden gewählt haben. Die unterschiedlichen Methoden bzw. Kombinationen sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: Von den Teilnehmern eingesetzte Methoden

| Methoden für die Mutationsanalyse | Teilnehmer | mit Erfolg (%) |
|--|------------|----------------|
| Sanger Sequenzierung | 4 | 4 (100) |
| Sanger Sequenzierung + Immunhistochemie (IHC) | 3 | 3 (100) |
| Pyrosequenzierung + Immunhistochemie (IHC) | 3 | 3 (100) |
| Immunhistochemie (IHC) | 3 | 1 (33) |
| Pyrosequenzierung | 1 | 1 (100) |
| Parallelsequenzierung („NGS“) + Allelspezifische PCR | 1 | 1 (100) |
| Parallelsequenzierung („NGS“) | 1 | 1 (100) |
| Parallelsequenzierung („NGS“) + Pyrosequenzierung | 1 | 1 (100) |

Für die Isolation der DNA aus den Paraffinschnitten wurden von den Teilnehmern sowohl manuelle (50%) als auch automatisierte (50%) Verfahren benutzt (Tab. 6).

Tabelle 6: Von den Teilnehmern verwendete DNA-Extraktionsmethoden und Kits für die molekularpathologische Mutationsanalyse

| Hersteller | DNA-Extraktionsmethode bei der molekularpathologischen Untersuchung | Teilnehmer | mit Erfolg (%) |
|---------------|---|------------|----------------|
| Promega | Automatisiert, Maxwell RSC DNA FFPE Kit | 6 | 6 (100) |
| Qiagen | Manuell, QIAamp DNA FFPE Kit | 3 | 3 (100) |
| Qiagen | Manuell, QIAamp DNA Micro Kit | 2 | 2 (100) |
| Qiagen | Manuell, QIAamp DNA Mini Kit | 1 | 1 (100) |
| Analytic Jena | Manuell, blackPREP FFPE Kit | 1 | 1 (100) |
| Promega | Automatisiert, Maxwell RSC FFPE Plus DNA Kit | 1 | 1 (100) |

Am häufigsten wurde das PyroMark System allein oder in Kombination mit einer anderen Plattform für die molekularpathologische Analyse eingesetzt (Tab 7).

Tabelle 7: Von den Teilnehmern verwendete Plattformen für die molekularpathologische Mutationsanalyse

| Hersteller | Plattform | Teilnehmer | mit Erfolg (%) |
|------------------------------|--------------------------------|------------|----------------|
| Qiagen | PyroMark | 5 | 5 (100) |
| ABI/Thermo Fisher Scientific | ABI 3500 Genetic Analyzer | 2 | 2 (100) |
| ABI/Thermo Fisher Scientific | ABI PRISM 310 Genetic Analyzer | 1 | 1 (100) |
| ABI/Thermo Fisher Scientific | ABI 3500Dx Genetic Analyzer | 1 | 1 (100) |
| ABI/Thermo Fisher Scientific | ABI 3730 DNA Analyzer | 1 | 1 (100) |
| ABI/Thermo Fisher Scientific | SeqStudio Genetic Analyzer | 1 | 1 (100) |
| Beckman Coulter | Beckman CEQ 8800 | 1 | 1 (100) |
| Illumina | MiSeq | 1 | 1 (100) |
| Thermo Fisher Scientific | Ion GeneStudio S5 | 1 | 1 (100) |
| | Andere | 2 | 2 (100) |

Die meisten Teilnehmer haben für die molekularpathologische Analyse In-house PCR- / NGS- oder Pyrosequenzierungsassays eingesetzt (Tab. 8).

Tabelle 8: Von den Teilnehmern verwendete Kits oder Panel für die molekularpathologische Mutationsanalyse

| Hersteller | Kit oder Panel | Teilnehmer | mit Erfolg (%) |
|--------------------------|--|------------|----------------|
| - | In-house PCR-Assay | 5 | 5 (100) |
| - | In-house NGS-Panel | 2 | 2 (100) |
| - | In-house Pyrosequenzierungsassays | 2 | 2 (100) |
| Promega | GoTaq® DNA Polymerase | 1 | 1 (100) |
| Thermo Fisher Scientific | AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase | 1 | 1 (100) |
| Qiagen | QIAseq Targeted DNA Panel / Custom Panel | 1 | 1 (100) |
| Qiagen | Pyro Gold Pyromark Kit | 1 | 1 (100) |
| | Andere | 2 | 2 (100) |

Die Teilnehmer, welche Immunhistochemie oder Immunhistochemie in Kombination mit einer molekularpathologischen Methode eingesetzt haben, haben verschiedene Mutations-spezifische Antikörper verwendet, welche in Tabelle 9 aufgelistet sind.

Tabelle 9: Von den Teilnehmern verwendete Antikörper für die immunhistochemische Mutationsanalyse

| Hersteller | Antikörper für die immunhistochemische Analyse | Teilnehmer | mit Erfolg (%) |
|--------------------------------------|--|------------|----------------|
| RevMAb Biosciences | Anti-Histone H3.3 G34R (RM240) | 4 | 2 (50) |
| RevMAb Biosciences / Dianova / Sigma | Anti-Histone H3 K27M (RM192) | 5 | 3 (60) |
| Millipore / - | Anti-Histone H3.3, K27M (ABE419) | 3 | 3 (100) |
| Millipore / - | Anti-H3K27me3 | 2 | 2 (100) |
| RevMAb Biosciences / Dianova | Anti-Histone H3.3 G34V (RM307) | 2 | 1 (50) |
| | Andere | 1 | 1 (100) |

Bei der Durchführung der Immunhistochemie wurde von den meisten Teilnehmern (44%) die VENTANA BenchMark XT Plattform eingesetzt (Tab. 10).

Tabelle 10: Von den Teilnehmern verwendete Plattformen für die immunhistochemische Mutationsanalyse

| Hersteller | Plattform für die immunhistochemische Analyse | Teilnehmer | mit Erfolg (%) |
|--------------|---|------------|----------------|
| Roche | VENTANA BenchMark XT | 4 | 3 (75) |
| Roche | VENTANA BenchMark ULTRA | 2 | 2 (100) |
| Agilent Dako | Dako Link 48 | 1 | 1 (100) |
| Agilent Dako | Dako Autostainer Plus | 1 | 0 (0) |
| Leica | Bond-MAX | 1 | 1 (100) |

Das am häufigsten eingesetzte Detektionssystem für die immunhistochemische Analyse war das ultraView Universal DAB Detection Kit, welches von 56% der Teilnehmer eingesetzt wurde (Tab. 11).

Tabelle 11: Von den Teilnehmern verwendete Detektionssysteme für die immunhistochemische Mutationsanalyse

| Hersteller | Detektionssystem für die immunhistochemische Analyse | Teilnehmer | mit Erfolg (%) |
|--------------|--|------------|----------------|
| Roche | ultraView Universal DAB Detection Kit | 5 | 4 (80) |
| Agilent Dako | EnVision FLEX, High pH | 2 | 1 (50) |
| Leica | Bond Polymer Refine Detection | 1 | 1 (100) |
| Roche | OptiView DAB IHC Detection Kit | 1 | 1 (100) |

3.5 Ungewöhnliche Vorkommnisse

Es gab keine ungewöhnlichen Vorkommnisse in dem Ringversuch H3F3A 2020.

4. Schlussfolgerung

Die QUIP GmbH hat im Jahr 2020 erstmalig einen neuropathologischen Ringversuch zur *H3F3A*-Mutationstestung in diffusen Gliomen angeboten. Der Ringversuch richtete sich an Fachärzte/innen für Neuropathologie sowie Fachärzte/innen für Pathologie, die neuroonkologisches Untersuchungsgut bearbeiten. Im Zeitraum vom 19. - 30.10.2020 wurde der offene Ringversuch durchgeführt, der von 88% der Teilnehmer erfolgreich absolviert wurde.

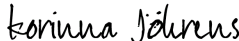
Alle Teilnehmer, die molekularpathologische Methoden oder eine Kombination aus Immunhistochemie und Molekularpathologie angewendet haben, haben den Ringversuch erfolgreich bestanden. Bei den Teilnehmern, die nur Immunhistochemie angewendet haben, lag die Erfolgsrate bei 33%. Dies spricht dafür, dass eine alleinige Bestimmung insbesondere der H3.3 G34R/V-Mutationen mittels immunhistochemischer Färbungen möglicherweise weniger verlässlich ist, als die molekulare bzw. kombinierte, d.h. immunhistochemische und molekulare Bestimmung.

Bericht erstellt von:

DocuSigned by:

240C47B2D6F4409...
Dr. rer. nat. L. Dimitrova, Datum
(Projektmanagement)

Freigabe (04.02.2021):

DocuSigned by:

29860CD9524B41E...
Prof. Dr. med. K. Jöhrens
(medizinische Beratung)

DocuSigned by:

BA88F4947EDD4EC...
Dr. rer. nat. Maja Grassow-Narlik
(Qualitätsmanagement)