DAkkS
Deutsche
Akkreditierungsstelle

Leitfaden des Sektorkomitees Pathologie/Neuropathologie für die Validierung von Untersuchungsverfahren in der Immunhistologie

71 SD 4 028 | Revision: 1.3 | 17. Mai 2016

zurückgezogen am 20.12.2023

Geltungsbereich:

Dieser Leitfaden gilt für alle akkreditierten Pathologien/Neuropathologien oder solche, die die Akkreditierung anstreben, in denen immunhistologische Untersuchungsverfahren angewendet und die Ergebnisse für die Diagnosestellung und Therapieentscheidung verwendet werden.

Dieses Dokument gibt technische und wissenschaftliche Anleitungen zur Erfüllung der Anforderungen an die Validierung und Verifizierung von immunhistochemischen Untersuchungsverfahren.

In diesem Leitfaden werden die Maßnahmen zur Validierung und Verifizierung von immunhistochemischen Untersuchungsverfahren beschrieben, die neu eingeführt oder ausgetauscht werden sollen (d. h. In-house-Verfahren).

Datum der Bestätigung durch den Akkreditierungsbeirat: 31.08.2016

Relevante Änderungen zur vorhergehenden Revision sind durch einen seitlichen Balken gekennzeichnet.

In diesem Dokument wird im Interesse der Lesbarkeit grundsätzlich die männliche Form von Funktionsbezeichnungen verwendet; dies schließt die weibliche Form ein.

Inhaltsverzeichnis

1 Zweck / Geltungsbereich ... 3

2 Begriffe und Abkürzungen ... 3

2.1 Abkürzungen ... 3

2.2 Begriffe ... 3

3 Beschreibung ... 6

3.1 Einleitung/Grundlagen ... 6

3.2 Gesetzliche Vorgaben ... 8

3.3 Verantwortlichkeiten ... 8

3.4 Einrichtungen, Materialien, Hilfsmittel ... 8

3.5 Durchführung der Validierung / Verifizierung ... 9

3.5.1 Allgemeine Anmerkungen zur Validierung und Verifizierung der Methode ... 9

3.5.2 Validierung der immunhistologischen Methoden bei In-house-Verfahren ... 9

3.5.3 Validierung bei Änderungen im Verfahren z. B. kurzfristiger Umstellung eines Antikörpers (Herstellerfirma, Charge etc.) oder Austausch eines Gerätes ... 11

3.5.4 Verifizierung des validierten Immunfärbeverfahrens in der Routinediagnostik ... 11

3.5.5 Validierung und Freigabe von Gewebeproben zum Einsatz als Positivkontrolle ... 14

3.5.6 Dokumentation und Archivierung von Validierungsdaten ... 14

3.6 Weitere Qualitätssicherungsmaßnahmen ... 15

4 Mitgeltende Unterlagen ... 16

zurückgezogen am 20.12.2023

1 Zweck / Geltungsbereich

Dieser Leitfaden gilt für alle akkreditierten Pathologien/Neuropathologien oder solche, die die Akkreditierung anstreben, in denen immunhistologische Untersuchungsverfahren angewendet und die Ergebnisse für die Diagnosestellung und Therapieentscheidung verwendet werden.

Dieses Dokument gibt technische und wissenschaftliche Anleitungen zur Erfüllung der Anforderungen an die Validierung und Verifizierung von immunhistochemischen Untersuchungsverfahren.

In diesem Leitfaden werden die Maßnahmen zur Validierung und Verifizierung von immunhisto-chemischen Untersuchungsverfahren beschrieben, die neu eingeführt oder ausgetauscht werden sollen (d. h. In-house-Verfahren).

2 Begriffe und Abkürzungen

2.1 Abkürzungen

AK	Antikörper
Ag	Antigen
MPG	Medizinproduktegesetz
MPV	Medizinprodukte-Verordnung
NWG	Nachweisgrenze
IVD	In-vitro-Diagnostika
OT	Objektträger

2.2 Begriffe

Antikörper- Klasse I	AK die in immunhistochemischen/-zytochemischen Tests verwendet und im Kontext von Histomorphologie, Zytomorphologie und klinischen Daten interpretiert werden. Sie dienen der qualitativen Differenzierung (z. B. Zellart und -differenzierung, Gewebezusammensetzung, Erregernachweis).
Antikörper- Klasse II	AK die in immunhistochemischen/-zytochemischen Tests aufgrund ihrer semiquantitativen Auswertung eine direkte Therapierelevanz haben (z. B. Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, Her2/neu z. B. beim Mammakarzinom)[1].

[1] Manche Antikörper können je nach Fragestellung in beide Klassen fallen (s. Anmerkung 1 in der Anlage).

zurückgezogen am 20.12.2023

„CE-Antikörper“	Antikörper mit CE-Kennzeichnung (CE-gekennzeichnete AK). Die Validierungsdaten wurden vom Hersteller erhoben und liegen vor.
Externe Kontrolle auf separatem OT	Diese ist eine validierte Kontrolle (positive oder negative), die auf einem separaten (nicht demselben) OT parallel zum diagnostischen Gewebe mitgeführt wird.
Externe On-slide Kontrolle	Die On-slide-Kontrolle ist eine validierte externe Kontrolle (positive oder negative), die zusammen mit dem diagnostischen Gewebe auf demselben OT aufgezogen und mitgeführt wird.
Externe Positivkontrolle	Ag in externem (ein anderer als der immunhistochemisch zu beurteilende diagnostische Gewebeschnitt), als geeignet bekanntem und freigegebenem Material (z. B. andere Gewebeproben, Zellkulturen oder vom Hersteller zur Verfügung gestelltes Material), das erwartungs-gemäß mit dem angewendeten AK eine Immunreaktion eingeht.
„In-house-Verfahren“	Von der Einrichtung für Pathologie/Neuropathologie (=Inspektionsstelle) selbst entwickelte oder auf der Basis externer wissenschaftlicher Arbeiten etablierte Verfahren (z. B. geänderte Verdünnung eines CE-gekennzeichneten Antikörpers, Änderung der Fixierungszeit von Probenmaterial). Die Einrichtung für Pathologie/Neuropathologie (=Inspektionsstelle) ist für den Nachweis der Eignung der Methode in der entsprechenden Anwendung verantwortlich (s. gesetzliche Vorgaben), wobei der Umfang der Validierung der Methoden unterschiedlich sein kann.
Interne Negativkontrolle	Ag innerhalb des immunhistochemisch zu beurteilenden diagnostischen Gewebeschnittes, das erwartungsgemäß mit dem angewendeten AK keine Immunreaktion eingeht.
Interne Positivkontrolle	Ag innerhalb des immunhistochemisch zu beurteilenden diagnostischen Gewebeschnittes, das erwartungsgemäß mit dem angewendeten AK eine Immunreaktion eingeht.
In-vitro-Diagnostika aus Eigenherstellung	„In-vitro-Diagnostika aus Eigenherstellung sind In-vitro-Diagnostika, die in Laboratorien von Gesundheitseinrichtungen hergestellt werden und in diesen Laboratorien oder in den Räumen in unmittelbarer Nähe zu diesen angewendet werden, ohne dass sie in den Verkehr gebracht werden. Für In-vitro-Diagnostika, die im industriellen Maßstab hergestellt werden, sind die Vorschriften über Eigenherstellung nicht anwendbar…“ (§ 3 Nr. 22 MPG)

Zurückgezogen am 20.12.2023

IVD	„Jedes Medizinprodukt, das als Reagenz, Reagenzprodukt, Kalibriermaterial, Kontrollmaterial, Kit, Instrument, Apparat, Gerät oder System - einzeln oder in Verbindung miteinander - nach der vom Hersteller festgelegten Zweckbestimmung zur In-vitro-Untersuchung von aus dem menschlichen Körper stammenden Proben, einschließlich Blut- und Gewebespenden, verwendet wird und ausschließlich oder hauptsächlich dazu dient, Informationen zu liefern über physiologische oder pathologische Zustände oder über angeborene Anomalien oder zur Prüfung auf Unbedenklichkeit und Verträglichkeit bei den potentiellen Empfängern oder zur Überwachung therapeutischer Maßnahmen.“ (RL 98/79/EG)
Konformitätsbewertung	Darlegungen, dass festgelegte Anforderungen bezogen auf ein Produkt, einen Prozess, ein System, eine Person oder eine Stelle erfüllt sind. (DIN EN ISO/IEC 17000:2005)
Leistungskenndaten	Sensitivität, Spezifität, Robustheit, Präzision etc.
Präzision Interassay	Präzision zwischen verschiedenen Reaktionsansätzen
Präzision Intraassay	Präzision innerhalb eines Reaktionsansatzes
Präzision/ Reproduzierbarkeit	Grad der Übereinstimmung zwischen den einzelnen unabhängigen Ergebnissen
Reaktionsansatz	Durchführung der kompletten immunhistochemischen Reaktion mit denselben Reagenzien (z. B. AK-Charge, Pufferansatz usw.) und Geräten.
Richtigkeit	Vergleich der Ergebnisse mit dem Evidenz-basierten Erwartungswert, Ermittlung und Bewertung der systematischen Abweichungen der Ergebnisse
Robustheit	Die Robustheit einer Methode ist ein Maß ihrer Fähigkeit, durch kleine, aber bewusste Veränderungen der Methodenparameter unbeeinflusst zu bleiben, und zeigt ihre Verlässlichkeit während der normalen Anwendung (z. B. Fixation).
Semiquantitativ	Näherungsweise Bestimmung der Menge eines Antigens (z. B. Hormonrezeptor) mit Angabe eines Wertes, der ungenauer ist als ein quantitativer Test und dessen Ergebnis in der Regel in kategorialen Werten (z. B. gering-, mittel-, hochgradig) ausgedrückt wird.

zurückgezogen am 20.12.2023

Sensitivität	Rate der echt positiven Ergebnisse. Die Sensitivität ist ein Maß für die Anzahl richtig positiver Ergebnisse verglichen mit der Gesamtzahl der positiven Ergebnisse (Anzahl richtig positiv + Anzahl falsch negativ).
Spezifität	Rate der echt negativen Ergebnisse. Die Spezifität ist ein Maß für die Anzahl richtig negativer Ergebnisse verglichen mit der Gesamtzahl der negativen Ergebnisse (Anzahl richtig negativ + Anzahl falsch positiv).
Validierung	Bestätigung durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die Anforderungen für einen spezifischen beabsichtigen Gebrauch oder eine spezifische beabsichtige Anwendung erfüllt worden sind. (ISO 9000:2005, 3.8.5, DIN EN ISO 15189:2014)
Verifizierung	Bestätigung durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass festgelegte Anforderungen erfüllt worden sind. (ISO 9000:2005, 3.8.4, DIN EN ISO 15189:2014) (s. Anmerkung 2 in der Anlage)

3 Beschreibung

3.1 Einleitung/Grundlagen

Die Inspektionsstelle muss alle nicht genormten, modifizierten genormten, genormten außerhalb des vorgesehenen Anwendungsbereichs benutzten und selbst entwickelten Untersuchungsverfahren validieren.

Die Art und der Umfang der Validierung sind von der Inspektionsstelle festzulegen.

Dieser Leitfaden gibt Empfehlungen zur Validierung der Untersuchungsverfahren in der Immunhistologie.

Die immunhistologische Untersuchung ist eine Inspektionstätigkeit. Die Auswertung von immunhistochemischen Reaktionen erfordert tiefgehende Fachkenntnisse sowie berufliche Erfahrung.

Die Validierung und Verifizierung des immunhistochemischen Verfahrens stellen die Reproduzierbarkeit und Robustheit des Verfahrens in der (Routine-) Diagnostik trotz Faktoren, die nicht zu beeinflussen sind (Struktur des Gewebes, Fixierungszeiten etc.), so gut wie möglich sicher.

Prinzipiell sind alle Untersuchungsverfahren auf ihre Leistungsfähigkeit zu prüfen, d. h. es muss nachgewiesen werden, dass die Leistungskenndaten eines Untersuchungsverfahrens den Forderungen des Anwenders (Facharzt für Pathologie) an die Präzision, Richtigkeit, Spezifität etc. entsprechen.

Die Validierung und die Verifizierung des Verfahrens sind als ineinander fließende Prozesse zu betrachten. Die Validierung bezieht sich bei den In-house Verfahren auf die Etablierung und Bestimmung des genauen Verfahrens vor der Freigabe für die Routinediagnostik.

zurückgezogen am 20.12.2023

Die kontinuierliche Verifizierung der angewendeten Verfahren in der Routinediagnostik ist als einer der wichtigsten Haus-internen Qualitätssicherungsmaßnahmen zu betrachten. Die Verifizierung muss sicherstellen, dass die Leistungsdaten, die bei der Validierung des Verfahrens ermittelt wurden, kontinuierlich erreicht werden und das Verfahren somit reproduzierbar und stabil abläuft.

Für die Verfahren die bereits vom Hersteller validiert wurden und genau gemäß Herstellervorgaben angewandt werden, beginnt die Verifizierung mit der Überprüfung der angegebenen Leistungs-kenn-daten im eigenen Institut, vor der Freigabe des Verfahrens für die Routinediagnostik.

Untersuchungsverfahren, die genau gemäß Herstellervorgaben angewandt werden:

Der Anwender muss bei CE-gekennzeichneten Antikörpern und Kits und genauer Umsetzung der Herstellervorgaben (die Methoden zum Einsatz der Antikörper und Kits wurden vom Hersteller validiert) sicherstellen, dass die vom Hersteller angegebenen Leistungskenndaten für Präzision und Richtigkeit auch in seinem Institut nachweisbar erreicht werden (Verifizierung) (s. Anmerkung 3 in der Anlage).

Untersuchungsverfahren, in denen von den Herstellervorgaben abgewichen wird (In-house Verfahren):

In diesem Fall (wenn z. B. eigene, nicht vom Hersteller empfohlene, AK-Verdünnungen anwendet werden) handelt es sich laut Gesetz um In-vitro-Diagnostika aus Eigenherstellung (s. Anmerkung 4 in der Anlage):

Sonderanfertigungen dürfen nur … in Betrieb genommen werden, wenn die grundlegenden Anforderungen nach § 7, die auf sie … anwendbar sind, erfüllt sind und das für sie vorgesehene Konformitätsbewertungsverfahren … durchgeführt worden ist…Für die Inbetriebnahme von Medizinprodukten aus Eigenherstellung … finden die Vorschriften des Satzes 1 (*für IVD: Erfüllung der Grundlegenden Anforderungen nach Anhang I der Richtlinie 98/79/EG, Konformitätsbewertungsverfahren in Analogie zu Sonderanfertigungen)* entsprechende Anwendung (Vgl. § 12 Abs. 1 MPG).

Das Konformitätsbewertungsverfahren ist in diesem Zusammenhang dem Validierungsverfahren gleich zu setzen.

Ferner verlangen die Akkreditierungsnormen eine vollständige Validierung (einschließlich Dokumentation der Validierungsergebnisse und Archivierung der Validierungsdaten) dieser Verfahren.

zurückgezogen am 20.12.2023

3.2 Gesetzliche Vorgaben

- Medizinproduktegesetz in der jeweils gültigen Fassung § 3 Nr. 21 und 22 MPG
- Richtlinie 98/79/EG
- § 5 Abs. 6 MPV

3.3 Verantwortlichkeiten

Verantwortlicher	Aktivität
MTA/BTA/CTA o. ä.	Technische Durchführung der Validierung/Verifizierung und Aufzeichnung der Validierungsdaten
Facharzt für Pathologie/ Neuropathologie	Vorgaben für Validierung/Verifizierung, Prüfung und Bewertung aller Validierung-/Verifizierungsergebnisse einschließlich der Freigabe der Methode und ihrer Einführung in die Diagnostik (s. Anmerkung 5 in der Anlage)

Die Leitung der Inspektionsstelle ist dafür verantwortlich, dass nur validierte Methoden für die Diagnostik verwendet werden. Sie hat jeweils Art und Umfang der zu überprüfenden Leistungskenndaten festzulegen und zu entscheiden, ob mit den ermittelten Ergebnissen die Zuverlässigkeit und Leistungsfähigkeit der Verfahren in der Weise gewährleistet werden kann, dass valide Ergebnisse reproduzierbar erzielt werden. Erst nach Prüfung und Bewertung aller Validierungsergebnisse erfolgt die Freigabe des Verfahrens durch den Facharzt für Pathologie/ Neuropathologie.

3.4 Einrichtungen, Materialien, Hilfsmittel

Einrichtungen, Materialien, Hilfsmittel müssen definiert und aufgelistet werden.

zurückgezogen am 20.12.2023

3.5 Durchführung der Validierung / Verifizierung

3.5.1 Allgemeine Anmerkungen zur Validierung und Verifizierung der Methode

Bei Verwendung CE-gekennzeichneter Antikörper und Kits muss exakt nach den Vorgaben (mit-gelieferte Produktinformation; „Waschzettel“) des Herstellers vorgegangen werden. In der Routine ist vorab eine Verifizierung vom Anwender durchzuführen. Dazu gehört die Überprüfung der Leistungskenndaten:

- Intraassay- und Interassay-Präzision
- Richtigkeit

(Anm.: Dieses Verfahren ist eine Ausnahme in der Pathologie/Neuropathologie.)
(s. Anmerkung 6 in der Anlage)

In der Pathologie/Neuropathologie werden überwiegend In-house-Verfahren angewandt (teilweise auch mit CE-gekennzeichneten Antikörpern z. B. mit von den Herstellervorgaben abweichender AK-Verdünnung, abweichender Fixierungszeit des zu untersuchenden Probengewebes oder sonstigen Abweichungen von den Herstellerangaben, siehe 3.1). Ein „In-house Verfahren“ muss vorab vollständig validiert werden. Dazu sind folgende Leistungskenndaten zu ermitteln:

- Intraassay- und Interassay-Präzision
- Richtigkeit
- Spezifität
- Ausreichende Sensitivität an geeignetem Testgewebe

(s. Anmerkung 7 in der Anlage)

3.5.2 Validierung der immunhistologischen Methoden bei In-house-Verfahren[2]

Alle Methoden dürfen nur dann für die Routinediagnostik freigegeben werden, wenn sie validiert sind (siehe auch Punkt 1.).

Bei der Auswahl eines geeigneten Antikörpers muss die Einsetzbarkeit des Antikörpers für die Methode (z. B.: Paraffingängigkeit; Gefrierschnitt) geprüft werden. Der diagnostische Wert des Antikörpers sollte generell wissenschaftlich (Evidenz-basiert) erwiesen bzw. begründet sein (z. B. fachspezifische Fortbildung, Fachliteratur).

Das Testgewebe muss angemessen und repräsentativ für die Fragestellung sein.

zurückgezogen am 20.12.2023

[2] s. Anlage: Abb. 1-7

Empfehlungen für die Gewebeauswahl zum Einsatz als Test-Gewebe bei Antikörpern der Klasse I (qualitativ) und der Klasse II (quantitativ/semiquantitativ):

Referenzmaterial/validiertes Kontrollmaterial mit vorgegebener und reproduzierbarer Stärke der Ziel-Antigen-Expression. Eigenes Testgewebe kann verwendet werden, die Ergebnisse müssen mit dem wissenschaftlich begründeten Erwartungswert (Evidenz-basiert) verglichen bzw. abgeglichen werden.

Negativkontrollen sollten bei der Validierung mitgeführt werden.

Bei der Methodendurchführung (z. B. Fixation, Einbettung, Vorbehandlung, Verdünnung, Inkuba-tionszeiten, Nachweissystem) muss die Sicherstellung der Reproduzierbarkeit und Robustheit so gut wie möglich gewährleistet sein (s. Anmerkung 8 in der Anlage).

Die Auswertung und Freigabe der Ergebnisse erfordern die Kompetenz des Facharztes, der das Ergebnis mit dem wissenschaftlich begründeten Erwartungswert (Evidenz-basiert, siehe oben) vergleicht bzw. abgleicht und bei Übereinstimmung, nach der Prüfung und Gewährleistung der entsprechenden Leistungskenndaten, die Freigabe für den Einsatz in der Routine-Diagnostik erteilt. (s. Anmerkung 9 in der Anlage)

Folgende Leistungskenndaten müssen vor der Freigabe gewährleistet und ermittelt werden:

<u>Intraassay-Präzision</u>

Das Verfahren muss mit einem Reaktionsansatz an unterschiedlichen Gewebeproben durchgeführt werden und den wissenschaftlich begründeten Erwartungswert erfüllen (Richtigkeit und Präzision).

<u>Interassay-Präzision</u>

Das Verfahren muss mit unabhängigen Reaktionsansätzen (im Sinne unterschiedlicher Läufe z. B. mit neuen Puffer-Ansätzen) an denselben Gewebeproben durchgeführt werden und den wissenschaftlich begründeten Erwartungswert erfüllen (Richtigkeit und Präzision). Je geschlossener dabei das verwendete immunhistochemische Färbeverfahren ist, desto weniger Parameter variieren zwischen den unabhängigen Reaktionsansätzen.

Anschließend sind die Abweichungen innerhalb (Intraassay) und zwischen (Interassay) den Serien zu bewerten.

zurückgezogen am 20.12.2023

Zusätzlich zu den Leistungskenndaten Intraassay-Präzision und Interassay-Präzision muss das Verfahren, soweit sinnvoll und notwendig, noch hinsichtlich Sensitivität und Spezifität überprüft werden. Hierfür ist ggf. das Mitführen von Negativkontrollen[3] notwendig.

3.5.3 Validierung bei Änderungen im Verfahren z. B. kurzfristiger Umstellung eines Antikörpers (Herstellerfirma, Charge etc.) oder Austausch eines Gerätes[4]

Wenn z. B. ein Gerät und/oder ein AK-Kit/AK-Charge ausgetauscht werden soll, ist ein Antikörper-/Färbeergebnis-Vergleich (Vergleich des immunhistochemischen Ergebnisses zwischen „altem“ und „neuem“ Verfahren) durchzuführen. Für diesen Zweck sind Gewebeproben in unterschiedlichen Ansätzen immunhistochemisch zu analysieren und auszuwerten.

Die Untersuchung von Gewebeproben mit dem alten und neuen Immunfärbeverfahren (Primär-, Sekundär-AK, Kit, Detektionssystem, Immunfärbeautomat) muss zu vergleichbaren oder wissenschaftlich begründeten besseren Ergebnissen führen. Bei Abweichungen hat der Facharzt für Pathologie/Neuropathologie zu entscheiden, ob das neue Immunfärbeverfahren freigegeben wird und dies in den Unterlagen (wenn für die spätere Nachvollziehbarkeit relevant) kurz zu begründen. Sollten die Gewebeproben keine übereinstimmenden Ergebnisse in der immunhistochemischen Reaktion aufweisen, ist das Immunfärbeverfahren nicht freizugeben und ggf. der Vergleich zu wiederholen.

(s. Anmerkung 11 in der Anlage)

3.5.4 Verifizierung des validierten Immunfärbeverfahrens in der Routinediagnostik[5]

Aufgrund der Variabilität des Probenmaterials (Gewebe) muss das validierte Verfahren in der Routinediagnostik durch ausreichende Qualitätskontrollen verifiziert werden. Dies bedeutet, in Abhängigkeit vom AK mindestens eine bekannte positive Gewebeprobe, bei Bedarf (z. B. Her-2/neu) eine bekannte schwach positive/grenzwertige, eine positive und eine negative Gewebeprobe mitzuführen. (s. Anmerkung 12 in der Anlage)

---

[3]

I. Negative Gewebekontrolle:
Gewebe, bei dem bekannt ist, dass es die untersuchte Ziel-Antigen-Struktur nicht besitzt - hierdurch kann eine unspezifische Kreuz-Reaktion, Hintergrundfärbung (z. B. bei zu langer Formalinfixierung) nachgewiesen werden. Dient dazu, die Spezifität der Zielantigen-Markierung durch den primären Antikörper zu verifizieren.

II. Negative Reagenzkontrolle:
Durch Weglassen des Primärantikörpers kann eine fehlende Spezifität des immunhistochemischen Verfahrens oder unspezifische Hintergrundfärbung nachgewiesen werden; entspricht einer „methodischen Kontrolle“ (s. Anmerkung 10 in der Anlage).

[4] s. Anlage Abb. 8-9

[5] s. Anlage Abb. 10-13

zurückgezogen am 20.12.2023

Folgende Kontrollen sind denkbar:

1. Interne Kontrolle

1.1. Interne Positivkontrolle

Stärken: Durchläuft die gleiche Entnahme, Lagerung und den gleichen Fixations- und Einbettungsprozess (einschließlich des Vorschneidens der Kontrollen) wie die diagnostische Zielstruktur.

Schwächen: nicht verwendbar bei fehlenden Referenzstrukturen.

1.2. Interne Negativkontrolle

Stärken: Durchläuft die gleiche Entnahme, Lagerung und den gleichen Fixations- und Einbettungsprozess (einschließlich des Vorschneidens der Kontrollen) wie die diagnostische Zielstruktur.

Schwächen: Nicht validierungsfähig.

2. Externe Kontrolle

Stärken: Kann validiert werden.

Schwächen: Durchläuft nicht die gleiche Entnahme, Lagerung und den gleichen Fixations- und Einbettungsprozess (einschließlich des Vorschneidens der Kontrollen) wie die diagnostische Zielstruktur.

2.1. Externe On-slide Kontrolle

Stärken: Kann akkurat validiert werden für das gesamte Immunfärbeverfahren, hat am besten alle Schritte wie das diagnostische Gewebe durchlaufen.

Schwächen: Ggf. erschwerte Sicherstellung einer gleichmäßigen Immunfärbereaktion auf der gesamten OT-Fläche (z. B. Gerätespezifika, Pipettierfehler, plane Lagerung des OT, Austrocknung).

2.2. Externe Kontrolle auf separatem OT

Stärken: Geringere Positionierungsprobleme auf dem OT.
Größere Gewebeproben (TMAs) möglich.
Gleichzeitig mehrere Positiv- und Negativkontrollen möglich.

Schwächen: Nicht dasselbe Immunfärbeverfahren wie bei dem diagnostischen Gewebe.

zurückgezogen am 20.12.2023

Als Qualitätskontrolle für die Verifizierung des validierten Immunfärbeverfahrens kann nur eine validierte Gewebeprobe verwendet werden. Hierbei bietet bei den meisten Systemen die An-wendung einer externen on-slide-Positivkontrolle den höchsten möglichen Qualitätsgrad innerhalb der Routinediagnostik, da sie alle Prozessschritte innerhalb des validierten immunhistochemischen Verfahrens parallel zum zu beurteilenden diagnostischen Gewebe durchläuft.

Zur Qualitätssicherung in der Durchführung der immunhistochemischen und immunzytochemischen Untersuchungsverfahren sind bei Antikörpern der Klasse II (siehe 2.2) grundsätzlich externe on-slide Positiv-Kontrollen mitzuführen.

Sollte diese Vorgehensweise aus technischen Gründen (z. B. Geräteeigenschaften, diagnostisches Gewebe, Kontrollgewebe) nicht sofort möglich sein, so ist hierfür übergangsweise zumindest eine validierte externe Kontrolle (auf einem separaten OT) pro AK, Lauf und Gerät als Positivkontrolle mitzuführen.

Bei Antikörpern der Klasse I ist eine interne Kontrolle ausreichend, wenn der Abgleich mit dem Testmaterial (das bei der Etablierung des AK verwendet wurde) möglich und nachweisbar ist. Dieser Abgleich soll die gleiche Reaktion der internen Kontrolle mit dem Testgewebe belegen und somit als Validierung der internen Kontrolle gelten. Liegt keine interne Positivkontrolle im diagnostischen Schnitt, vor ist mindestens eine validierte externe Kontrolle (auf einem separaten OT oder on-slide-Kontrolle) pro AK, Lauf und Gerät als Positivkontrolle mitzuführen.

Sämtliche Kontrollen (sowohl extern als auch intern) sind zur Rückverfolgbarkeit des Validierungs-/Verifizierungsverfahrens entsprechend zu archivieren.
(Dieser kursive Abschnitt stellt einen Beschluss des Sektorkomitees Pathologie/Neuropathologie dar und ist somit verbindlich.)
(s. Anmerkungen 13 und 14 in der Anlage)

Wenn die Ergebnisse für die Qualitätskontrollen innerhalb des zulässigen Bereichs liegen, kann die Freigabe der Untersuchungsergebnisse erfolgen.

Soweit vorhanden, müssen interne Positiv- und Negativkontrollen stets berücksichtigt werden. Diese müssen dem wissenschaftlich begründeten Erwartungswert (Evidenz-basiert) entsprechen, können jedoch nicht zur Verifizierung des validierten immunhistochemischen Verfahrens als Einzelkontrolle verwendet werden.

zurückgezogen am 20.12.2023

3.5.5 Validierung und Freigabe von Gewebeproben zum Einsatz als Positivkontrolle[6]

Gewebeproben dürfen nur dann als Positivkontrolle für die Immunhistologie in der Routinediagnostik eingesetzt werden, wenn sie validiert sind.

Das zu validierende Kontrollgewebe muss angemessen und repräsentativ für die Fragestellung sein.

Bei der Methodendurchführung (z. B. Fixation, Einbettung, Vorbehandlung, Verdünnung, Inkuba-tionszeiten, Nachweissystem) muss so gut wie möglich die Sicherstellung der Reproduzierbarkeit und Robustheit gewährleistet sein.

Die Auswertung und Freigabe der Ergebnisse erfordern die Kompetenz des Facharztes. Er vergleicht (bzw. gleicht ab) das Ergebnis des zu validierenden Kontrollgewebes mit dem bei der AK-Validierung erzielten Ergebnis unter der Berücksichtigung des wissenschaftlich begründeten Erwartungswertes (siehe oben). Bei Übereinstimmung, nach der Prüfung und Gewährleistung der entsprechenden Leistungskenndaten, kann die Freigabe für Kontrollgewebe in der Routinediagnostik erfolgen.
(s. Anmerkungen 15 und 16 in der Anlage)

3.5.6 Dokumentation und Archivierung von Validierungsdaten

Die Durchführung der Methodenvalidierung ist zu dokumentieren und mit allen Rohdaten und den resultierenden Ergebnissen zu archivieren. Ebenfalls sollten allgemeine Bemerkungen oder Hinweise, die unter Umständen für die Methodendurchführung hilfreich sind, aufgezeichnet und archiviert werden.

Die Unterlagen sind 5 Jahre aufzubewahren. Nach diesem Zeitraum entscheidet der Facharzt für Pathologie/Neuropathologie über die weitere Archivierung.

Die Objektträger, die der Rückverfolgbarkeit des Validierungsverfahrens dienen (einschließlich Chargenwechsel, Validierung vom Kontrollmaterial etc.), sind 5 Jahre aufzubewahren. Eine Aufbewahrung in digitalisierter Form ist möglich. Es besteht keine Aufbewahrungspflicht für die Testimmunreaktionen, die während des Validierungsverfahrens ausgesondert wurden.

Sämtliche Objektträger, die der Rückverfolgbarkeit des Verifizierungsverfahrens dienen (Kontrollen, die in der Routine geführt werden), sind 10 Jahre (zu dem Fall zuordenbar) aufzubewahren.

zurückgezogen am 20.12.2023

[6] s. Anlage Abb. 14

3.6 Weitere Qualitätssicherungsmaßnahmen

Interne Qualitätssicherungsmaßnahmen können unter anderem auch Folgendes beinhalten:

- Verwendung von anerkannten Referenzmaterialien, vom Hersteller angebotenes Kontrollmaterial oder Zelllinien aus Stammsammlungen oder von Referenzlaboratorien
- Wiederholungsinspektionen oder Beurteilung eines Falles durch einen weiteren Kollegen aus demselben Institut

Externe Qualitätssicherungsmaßnahmen können unter anderem auch Folgendes beinhalten:

- Teilnahme an Eignungsprüfungen (z. B. an Ringversuchen)
- Benchmarking
- Teilnahme an Qualitätszirkeln
- Beurteilung eines Falles durch einen externen Kollegen oder den Fachbegutachter im Rahmen des Akkreditierungsverfahrens

zurückgezogen am 20.12.2023

4 Mitgeltende Unterlagen

1. The Total Test Approach to Standardization of Immunohistochemistry (Arch Pathol Lab Med, Vol 124, 2000)
2. A Practical Approach for Evaluation New Antibodies in the Clinical Immunohistochemistry Laboratory (Arch Pathol Lab Med Vol 125, 2001)
3. Recommandation for improved Standardization of Immunohistochemistry (Appl Immunohistochem Mol Morphol Vol 15, Nr 2, 2007)
4. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories (J Vet Diagn Invest 20: 393-413, 2008)
5. Canadian Association of Pathologists-Association canadienne des pathologistes National Standards Comitee/Immunohistochemistry (Am J Clin Pathol 2010; 133:354-365)
6. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommandations for Immunhistochemical Testing of Estrogen and Progesteron Receptors in Breast Cancer (Journal of Clinical Oncology; 2010 Vol.28, Nr. 16)
7. Recommandation for Validating Estrogen and Progesteron Receptor Immunhistochemitry Assays (Arch Pathol Lab Med, Vol 134, 2010)
8. Effects of Preanalytic Variables on the Detection of Proteins by Immunhistochemistry in Formalin-fixed, Paraffin-Embedded Tissue (Arch Pathol Lab Med, Vol 135, 2011)
9. Antibody validation (Jennifer Bordeaux, Allison W. Welsh, Seema Agarwal, Elizabeth Killiam, Maria T. Baquero, Jason A. Hanna, Valsamo K. Anagnostou, and David L. Rimm/Department of Pathology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA; BioTechniques, Vol. 48, No. 3, March 2010, pp. 197–209)

zurückgezogen am 20.12.2023