

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

71 SD 4 028 A1 | Revision: 1.0 | 10. November 2013

Hinweis:

Diese Anlage entstand durch die Übernahme von Kommentaren des Unterausschusses „Immunhistologie“ der DAkkS. In diesem Unterausschuss waren tätig (alphabetische Reihenfolge):

PD Dr. med. S. Falk (Frankfurt); Prof. Dr. med. F. Hofstädter (Regensburg); Dr. med. O. Kaufmann (Cottbus); PD Dr. med. A. Lebeau (Lübeck); Prof. Dr. med. P. Schirmacher (Heidelberg); Prof. Dr. med. Dr. h.c. H. Stein (Berlin); Dr. med. S. Wagner und Kollegen: Dr. med. S. Bartho, Dr. med. U. Kerlikowski, Dr. med. K. Zels (Königs Wusterhausen).

Die Abbildungen 1-14 wurden von Frau PD Dr. med. F. Bataille (Amberg) erstellt und im Rahmen der DAkkS-Veranstaltung zu diesem Thema am 08.03.2013 präsentiert.

Datum der Bestätigung durch den Akkreditierungsbeirat: 31.01.2014

Die Hinweise im Anhang folgen der Gliederung des Leitfadens 71 SD 4 028.

1 Zweck / Geltungsbereich

2 Begriffe und Abkürzungen

2.1 Abkürzungen

2.2 Begriffe

Anmerkung 1:

In die Antikörper-Klasse I gehören jene Antikörper die im Kontext von Histomorphologie und klinischen Daten/Angaben ausgewertet werden. Diese Antikörper dienen der Bestimmung der Zelldifferenzierung. Dieser Kategorie wird die überwiegende Zahl an immunhistochemischen Untersuchungen zugeordnet.

Die immunhistochemischen Untersuchungen, deren Ergebnis in Hinblick auf eine prognostische oder prädiktive Aussage für sich alleine betrachtet wird, werden der Antikörper-Klasse II zugeordnet. Das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung mit einem Antikörper-Klasse II stellt eine unabhängige diagnostische Information dar und beeinflusst das individuelle Therapiemanagement des einzelnen Patienten, z.T. auch auf der Grundlage geforderter semiquantitativer Bewertungen der Immunreaktionen. Ein klassisches Beispiel ist die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus beim Mammakarzinom und der Ki67-Index bei neuroendokrinen Tumoren.

Zwischen der Antikörper-Klasse I und Klasse II gibt es eine Schnittmenge an Antikörpern, die in Abhängigkeit ihrer Interpretation in Klasse I oder Klasse II gehören. So kann ein Antikörper für den Östrogenrezeptor zur Bestimmung des Primarius bei einer Metastase eingesetzt werden – und würde in dieser Funktion als Antikörper-Klasse I eingestuft. Hingegen fungiert er als Antikörper-Klasse II bei der Bestimmung der Östrogenrezeptorpositivität eines Mammakarzinoms mit dem Ziel der Therapiestratifizierung bei der jeweiligen Patientin.

Anmerkung 2:

Der Begriff Verifizierung wird in diesem Dokument im Sinne der Definitionen aus den Standards: EN ISO 9000:2005, ISO/IEC 17025:2005 und EN ISO 15189:2012 verwendet.

„Validierte Untersuchungsverfahren von Verfahrensentwicklern, die ohne Veränderungen benutzt werden, sind vor der Einführung in den routinemäßigen Gebrauch einer Verifizierung zu unterziehen.“ (EN ISO 15189:2012, 5.5.1.2)

Der Begriff Verifizierung wird in diesem Dokument **nicht** für die Leistungsbewertungsprüfung bzw. Konformitätsbewertung des Herstellers von IVD verwendet.

3 Beschreibung

3.1 Einleitung Grundlagen

Anmerkung 3:

Es gibt kommerziell erhältliche Antikörper, die gar nicht, suboptimal oder sogar anders reagieren als im Datenblatt beschrieben. Darüber hinaus muss eine eventuelle Kontamination ausgeschlossen werden. Grundsätzlich hat der Facharzt für Pathologie/Neuropathologie die Verantwortung für eine im Sinne der Diagnostik sichere Vorgehensweise.

Anmerkung 4:

Die Antikörper müssen mit dem im eigenen Labor etablierten Detektionssystem auf ein optimales Ergebnis der Immunfärbung geprüft werden. Dabei kann es zu wesentlichen Abweichungen von den Herstellerangaben kommen. Das Ziel darf nicht das unkritische Befolgen von Herstellerangaben sein, sondern eine „optimale Darstellung des Antigens“, die zur richtigen Beantwortung der Fragestellung führt.

Her2/neu ist ein Antigen mit Besonderheiten. Hier muss – wie bei jeder semiquantitativen Auswertung - eine Validierung erfolgen, die sich auf Standards mit bekanntem Gehalt an Molekülen bezieht.

3.2 Gesetzliche Vorgaben

3.3 Verantwortlichkeiten

Anmerkung 5:

Die genaue Kenntnis der Expression bzw. der Expressionsvielfalt (Reaktivität mit mehr als nur einer Zellart) und des Expressionsmusters (Kern, Membran, Zytoplasma) diagnostisch nachzuweisenden Antigens (Ag) wird für den zuständigen Facharzt für Pathologie vorausgesetzt. Zur genauen Kenntnis gehört auch das Wissen um die Stärken und Schwächen eines Antikörpers und dessen Neigung zu Artefakten.

3.4 Einrichtungen, Materialien, Hilfsmittel

3.5 Durchführung der Validierung / Verifizierung

3.5.1 Allgemeine Anmerkungen zur Validierung und Verifizierung der Methode

Anmerkung 6:

Aufgrund der Spezifika der pathologisch-anatomischen Zell- und Gewebediagnostik ist dieses Verfahren eher theoretisch. Der Bezug auf Standards und die morphologische Beurteilung der Ergebnisqualität sind entscheidend. Inwiefern man exakt nach den Vorgaben des Herstellers vorgehen kann und ob dieses Vorgehen überhaupt möglich ist, muss der Facharzt für Pathologie/Neuropathologie entscheiden. Hersteller betonen, dass sie die Haftung nur übernehmen, wenn ihre Bedingungen exakt eingehalten werden.

Anmerkung 7:

Über den Umfang der Validierung (z. B. wie viele verschiedene Testgewebe für die Validierung eingesetzt werden) und über die Leistungsdaten eines Verfahrens entscheidet der zuständige Facharzt für Pathologie/Neuropathologie. Der Umfang der Validierung hängt von unterschiedlichen Faktoren ab wie z. B. der Art des AK (CE-gekennzeichneter AK oder für Forschungszwecke bestimmte AK), der Art der untersuchten Gewebe, der Fixation, der Einbettungsvorgänge, dem Ausbetten (Paraffintemperatur und -güte), Trocknungsvorgang etc.

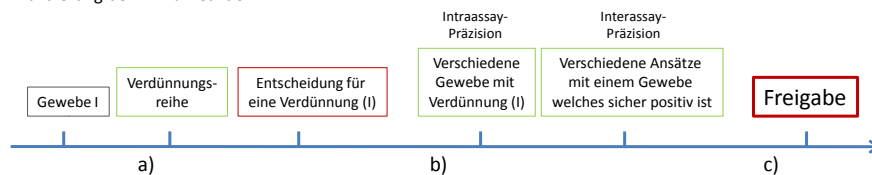
Auch ausschließlich für Forschung deklarierte Antikörper („For research use only“) können nach einer entsprechenden Validierung in der Routinediagnostik verwendet werden. Wichtig ist die genaue Kenntnis der Expression bzw. der Expressionsvielfalt (Reaktivität mit mehr als nur einer Zellart) und des Expressionsmusters (Kern, Membran, Zytoplasma) des diagnostisch nachzuweisenden Antigens (Ag), ebenso das Wissen um die Stärken und Schwächen eines Antikörpers und dessen Neigung zu Bildung von Artefakten.

3.5.2 Validierung der immunhistochemischen Methoden bei In-house-Verfahren

Abb. 1

Immunhistologie

I. Validierung der Immunreaktion:



II. Validierung einer Positivkontrolle:

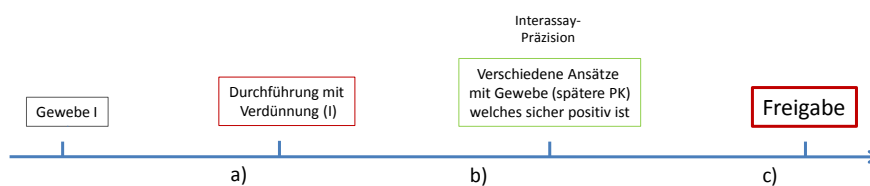


Abb. 2: Soll ein Antikörper in der Routinediagnostik neu eingeführt werden, so bedarf er zunächst einer Validierung. Das hierfür verwendete Testgewebe muss angemessen und für die Fragestellung repräsentativ sein.

1) Validierung eines Antikörpers in der Immunhistologie (1)

in der internationalen Literatur verwendeter Begriff für die Etablierung eines Antikörpers in der Immunhistologie innerhalb einer Inspektionsstelle (Bereich Pathologie)

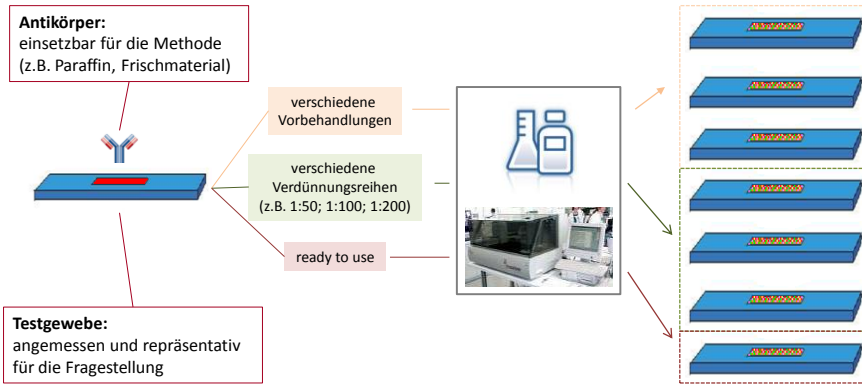


Abb. 3:

1) Validierung eines Antikörpers in der Immunhistologie (2)

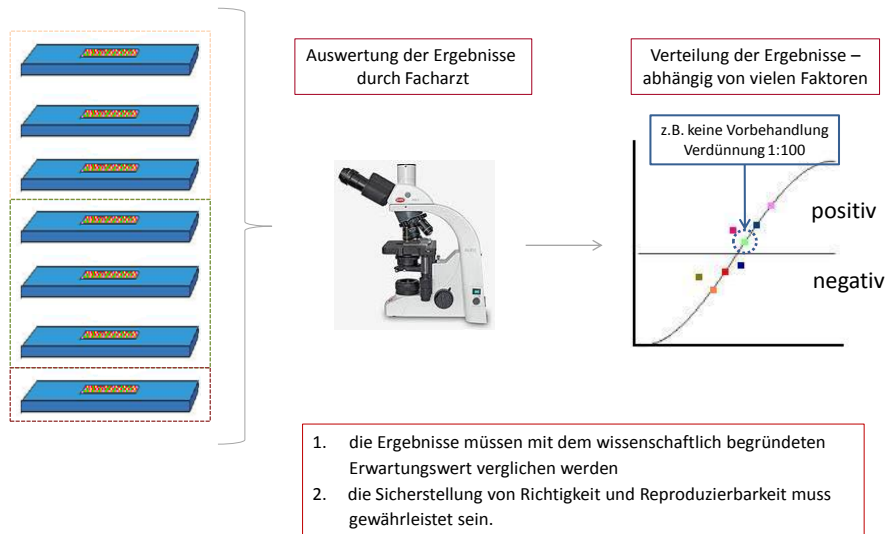


Abb. 4: Die Interassay- und Interassay-Präzision sind Leistungsdaten der Validierung – sie dienen der Überprüfung der präanalytischen und analytischen Variablen innerhalb einer immunhistochemischen Reaktion.

Präanalytische, analytische und postanalytische Variablen beeinflussen das Ergebnis der immunhistochemischen Reaktion und Ergebnisinterpretation.

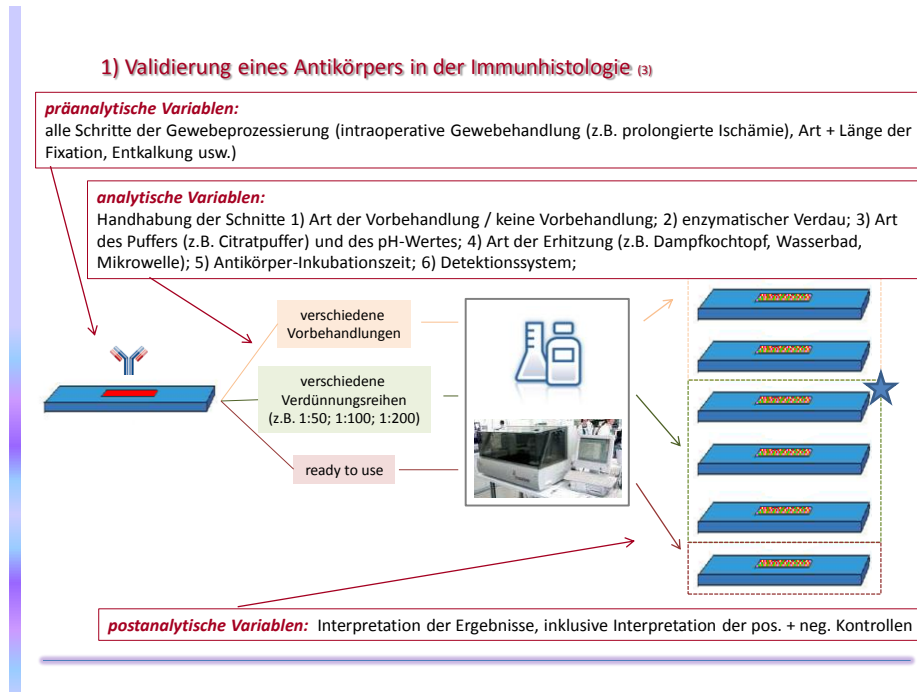


Abb. 5:

1) Validierung eines Antikörpers in der Immunhistologie (4)

Intraassay-Präzision [Überprüfung der präanalytischen Variablen]
das immunhistologische Verfahren muss mit einem Reaktionsansatz an unterschiedlichen Gewebeproben durchgeführt werden und den wissenschaftlich begründeten Erwartungswert erfüllen (*Richtigkeit und Präzision*)



Abb. 6: Je geschlossener das verwendete immunhistochemische Färbeverfahren ist, desto weniger Parameter variieren zwischen den unabhängigen Reaktionsansätzen.

1) Validierung eines Antikörpers in der Immunhistologie (5)

Interassay-Präzision [Überprüfung der analytischen Variablen]
das immunhistologische Verfahren muss mit unabhängigen Reaktionsansätzen (im Sinne unterschiedlicher Läufe mit neuen Puffer-Ansätzen) an denselben Gewebeproben durchgeführt werden und den wissenschaftlich begründeten Erwartungswert erfüllen (*Richtigkeit und Präzision*)



Aufgrund der Individualität der Antikörper lässt sich der Umfang der zu überprüfenden Leistungsdaten (z. B. wie viele verschiedene Testgewebe werden für die Intraassay-Präzision verwendet, an wie vielen verschiedenen Reaktionsansätzen erfolgt die Interassay-Präzision) kaum generell festlegen. Die Entscheidung muss für jeden einzelnen Antikörper neu getroffen werden. Hierbei liegt die Verantwortung für eine im Sinne der Diagnostik sichere Vorgehensweise und für sämtliche Entscheidungen bezüglich der Durchführung des Validierungs-/Verifizierungsverfahrens beim verantwortlichen Facharzt für Pathologie/Neuropathologie.

Abb. 7:

1) Validierung eines Antikörpers in der Immunhistologie (6)

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

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:

Verwendung eines Isotyp-Kontrollantikörpers - kann eine fehlende Spezifität des immunhistochemischen Verfahrens nachweisen oder unspezifische Hintergrundfärbung = entspricht einer „methodischen Kontrolle“

Sensitivität
(Richtig-Positiv-Rate)

$$\frac{\text{Anzahl richtig pos.}}{\text{Anzahl richtig pos.} + \text{Anzahl falsch neg.}}$$

Spezifität
(Richtig-Negativ-Rate)

$$\frac{\text{Anzahl richtig neg.}}{\text{Anzahl richtig neg.} + \text{Anzahl falsch pos.}}$$

Anmerkung 8:

Es gibt eine Reihe von Parametern, die das Untersuchungsverfahren beeinflussen und z. T. nur bedingt kontrolliert werden können:

- Die Vielzahl von möglichen Variablen aus der Phase der Probenvorbereitung: Fixation, Einbettungsvorgänge (Rezepte, Dauer, Reagenzien, Temperatur), das Ausbetten (Paraffintemperatur und -güte), Trocknungsvorgang u. ä.
- Das Immunhistochemische Färbeverfahren selbst: Antigendemaskierung, Antikörper-eigenschaften, -menge, -konzentration, Grenzflächenphänomene, elektrostatische Einflüsse, Inkubationszeit, Eigenschaften der Detektionssysteme und Chromogene u. ä.

Anmerkung 9:

Die Verantwortung und sämtliche Entscheidungen bezüglich der Durchführung des Validierungs-/Verifizierungsverfahrens liegen bei dem Facharzt für Pathologie/Neuropathologie.

Anmerkung 10:

Isotyp-Kontrollen sind für monoklonale Antikörper die bevorzugte Wahl. Bei polyklonalen Antikörpern sollten Verdünnungen der Immunglobulin-Fraktion nichtimmunisierter Tiere der gleichen Spezies verwendet werden oder das Präimmenserum desselben Tiers.

Auf das Mitführen von Negativkontrollen zur Beurteilung von Sensitivität und Spezifität kann in folgenden Fällen verzichtet werden:

- Wenn das Testgewebe und auch das Kontrollgewebe für die externen On-slide-Kontrollen so ausgesucht werden, dass positive und negative Strukturen enthalten sind.
- Negative Reagenzkontrollen, bei denen der primäre AK durch Puffer ersetzt wird, erübrigen sich bei Systemen wie BenchMark Ultra, da das System mit einem einzigen sekundären AK arbeitet, der Maus und Kaninchen erkennt und somit für alle primären AK im Haus derselbe ist und tagtäglich eingesetzt und verifiziert wird.

Bei einem Spezieswechsel, der auch mit einem Wechsel des sekundären AK einhergeht, ist eine negative Reagenzkontrolle notwendig.

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

Abb. 8:

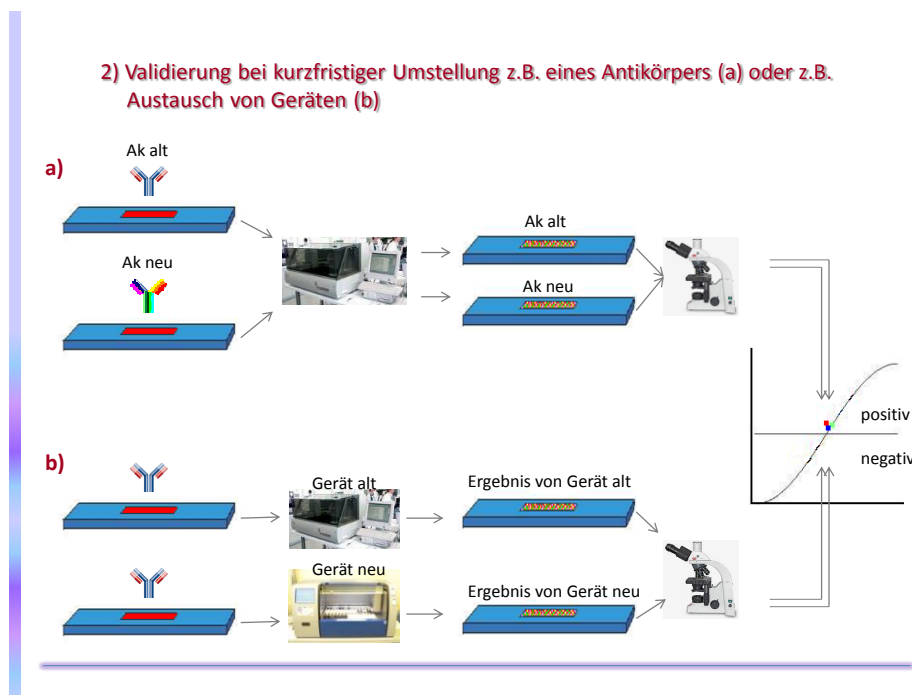


Abb. 9:

2) Validierung bei kurzfristiger Umstellung z.B. eines Antikörpers (a) oder z.B. Austausch von Geräten (b)

Weitere Veränderungen, die eine Re-Validierung des immunhistochemischen Färbeverfahrens bedingen:

Änderung z.B.:

- des Antikörper-Klons / der Antikörper-Charge
- der Antikörperkonzentration
- des Detektionssystems
- des Puffersystems / -art
- des immunhistochemischen Färbeautomaten

Eine Re-Validierung des immunhistochemischen Färbeverfahrens ist bei jeglicher Änderung eines Parameters der zuvor validierten immunhistochemischen Reaktion notwendig!

Je geschlossener ein System, umso weniger Parameter bedingen eine Re-Validierung des immunhistochemischen Färbeverfahrens!

Anmerkung 11:

In der Praxis sollte eine Validierung z. B. in folgenden Fällen erfolgen:

- Bei einem neuen AK
- Bei einem neuen AK-Klon
- Wenn der AK von einem neuen Hersteller bezogen wird
- Wenn der Geräte-Typ gewechselt wird

Eine Verifizierung könnte z. B. in folgenden Fällen reichen:

- Bei einer neuen AK-Charge
- Bei einer vom Hersteller neu eingestellten AK-Konzentration
- Wenn ein neues aber vom Typ her gleiches Gerät gekauft wird
- Wenn eine neue Art des Detektionssystem eingeführt wird, kann zuerst nur verifiziert werden, ggf. müssen einzelne AK neu validiert werden
- Wenn ein neues Puffersystem eingeführt wird, ggf. müssen einzelne AK neu validiert werden

3.5.4 Verifizierung des validierten Immunfärbeverfahrens in der Routinediagnostik

Abb. 10:

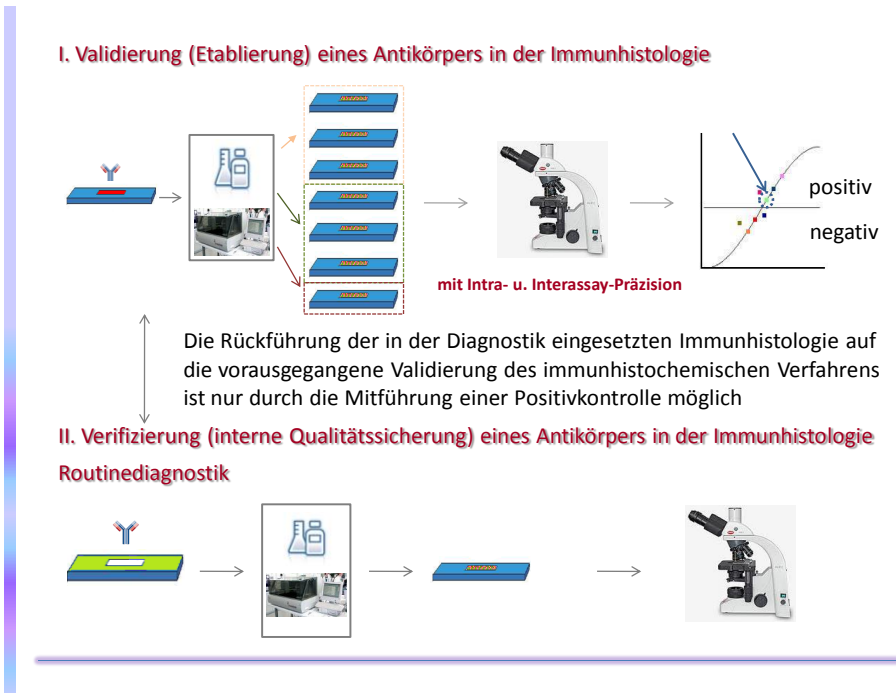


Abb. 11:

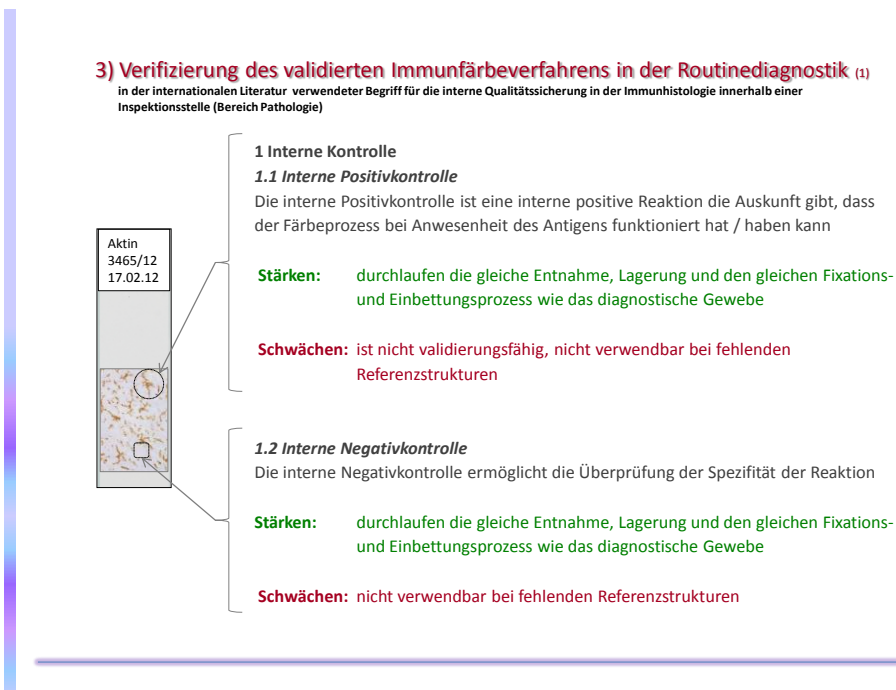
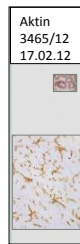


Abb. 12:

3) Verifizierung des validierten Immunfärbeverfahrens in der Routinediagnostik ⁽²⁾



2 Externe Kontrolle

Stärken: können validiert werden

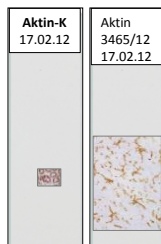
Schwächen: durchlaufen nicht die gleiche Entnahme, Lagerung und den gleichen Fixations- und Einbettungsprozess wie das diagnostische Gewebe

2.1 On-slide Kontrolle

Die On-slide-Kontrolle ist eine validierte externe (positive oder negative) Kontrolle, die auf demselben OT wie das diagnostische Gewebe mitgeführt wird

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

Schwächen: 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

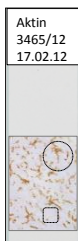
Diese ist eine validierte externe Kontrolle (positive oder negative), die auf einem separaten (nicht demselben) OT parallel zum diagnostischen Gewebe mitgeführt wird

Stärken: geringere Positionierungsprobleme auf dem OT
größere Gewebeprobe (TMA) möglich
gleichzeitig mehrere Positiv- und Negativkontrollen möglich

Schwächen: nicht das selbe Immunfärbeverfahren wie bei dem diagnostischen Gewebe

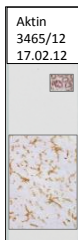
Abb. 13:

3) Verifizierung des validierten Immunfärbeverfahrens in der Routinediagnostik ⁽³⁾



int. PK diagn. Gw. Ergebnis

int. PK	diagn. Gw.	Ergebnis
+	+	IH-Reaktion hat evtl. funktioniert, falsch pos. Reaktion mgl., auf Ergebnis der Validierung nicht rückführ- u. vergleichbar
+	-	IH-Reaktion hat evtl. funktioniert, falsch pos. Reaktion in PK mgl., auf Ergebnis der Validierung nicht rückführ- u. vergleichbar
-	+	IH-Reaktion hat wahrscheinlich nicht funktioniert, falsch pos. Reaktion im diagn. Gw. mgl., nicht auswertbar, wdh.
-	-	IH-Reaktion hat nicht funktioniert, nicht auswertbar, wdh.



ext. PK diagn. Gw. Ergebnis

ext. PK	diagn. Gw.	Ergebnis
+	+	IH-Reaktion hat funktioniert, Ergebnis auswertbar, auf Ergebnis der Validierung rückführ- u. vergleichbar
+	-	IH-Reaktion hat funktioniert, Ergebnis auswertbar, auf Ergebnis der Validierung rückführ- u. vergleichbar
-	+	IH-Reaktion hat nicht funktioniert, falsch pos. Reaktion im diagn. Gw., nicht auswertbar, wdh.
-	-	IH-Reaktion hat nicht funktioniert, nicht auswertbar, wdh.

Anmerkung 12:

Das Wissen über Eigenschaften der Antikörper (Kreuzreaktivität, etc.) und das Expressionsmuster von Antigen/Zielstrukturen wird vorausgesetzt. Bei fehlendem Wissen (u. U. auch als Ausdruck mangelnder wissenschaftlicher Datenlage) kann es trotz guter Qualität der Immunfärbung zu Fehlbeurteilungen kommen.

Bei der Abschätzung von Färbeintensitäten sind Gewebestandards mit bekanntem Gehalt an Molekülen entscheidend.

Anmerkung 13:

Die Verwendung von Patientenmaterial als Kontrollmaterial ist im § 24 des MPG geregelt. Dieser Abschnitt ermöglicht die Verwendung von Restgewebe, welches entsorgt werden müsste und für den Patienten nicht mehr diagnoserelevant ist oder für andere Zwecke (für den Patienten) aufbewahrt werden muss.

Die §20 bis 23 b:

§ 20 Allgemeine Voraussetzungen zur klinischen Prüfung

§ 21 Besondere Voraussetzungen zur klinischen Prüfung

§ 22 Verfahren bei der Ethik-Kommission

§ 22a Genehmigungsverfahren bei der Bundesoberbehörde

§ 22b Rücknahme, Widerruf und Ruhen der Genehmigung oder der zustimmenden Bewertung

§ 22c Änderungen nach Genehmigung von klinischen Prüfungen

§ 23 Durchführung der klinischen Prüfung

§ 23a Meldungen über Beendigung oder Abbruch von klinischen Prüfungen

§ 23b Ausnahmen zur klinischen Prüfung

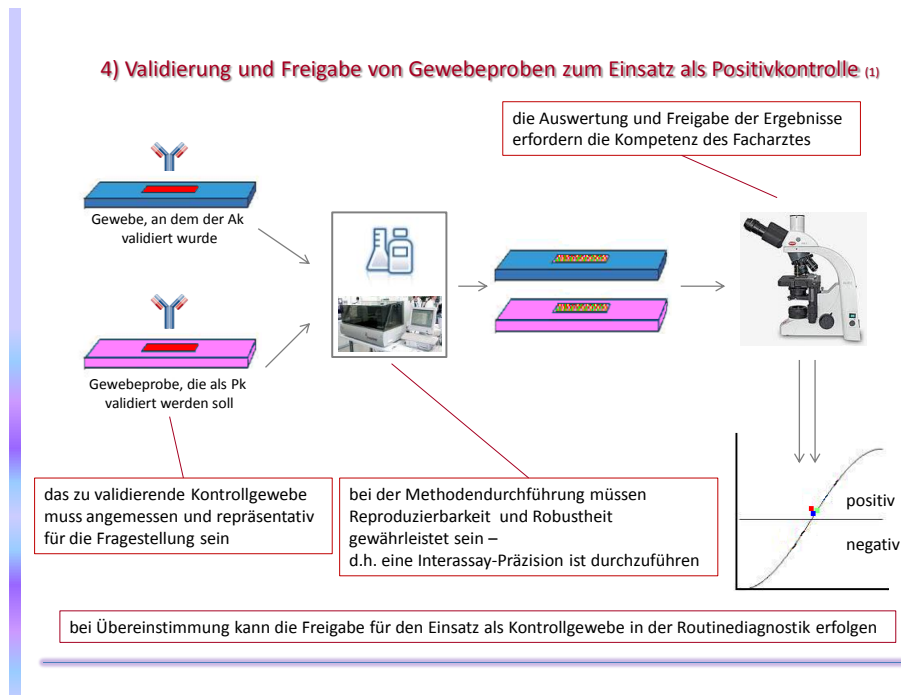
sind nur in den erwähnten 3 Fällen des § 24 zu berücksichtigen. Der § 24 sagt in dem letzten Satz klar, dass eine Einwilligung des Patienten nur dann erforderlich ist, wenn das Persönlichkeitsrecht oder kommerzielle Interessen des Patienten berührt sind. Beides trifft beim Material, was zu entsorgen ist, nicht zu.

Anmerkung 14:

Die Multiblocktechnik kann in vielen Fällen durch eine entsprechende Auswahl von Geweben das mögliche Problem der fehlenden Positiv- oder Negativkontrollstruktur im Testgewebe eliminieren.

3.5.5 Validierung und Freigabe von Gewebeproben zum Einsatz als Positivkontrolle

Abb. 14:



Anmerkung 15:

In der Regel ist es vorzuziehen, Normalgewebe mit vorhersagbarer Antigenexpression als Positivkontrolle zu verwenden anstatt von Tumorgewebe mit variabler Expression.

Es wird empfohlen, Positivkontrollen zu verwenden, die auch Zellen oder Gewebe enthalten, die das Antigen erwartungsgemäß nicht exprimieren.

Beispiele in Hinblick auf die Wichtigkeit des richtigen Testgewebes zur Validierung eines Antikörpers und der eingeschränkten Aussagekraft interner Positivkontrollen:

1. CD 117

- Die Expression von CD 117 in GIST variiert von negativ bis stark positiv.
- Mastzellen innerhalb GIST und in der angrenzenden Muskulatur zeigen eine starke CD117-Expression (oft höher als im angrenzenden GIST).
- Die Sensitivität für CD117 sollte so gewählt werden, dass auch schwach CD117-positive GIST erkannt werden.
- Werden stark CD117-exprimierende GIST oder Mastzellen als Positivkontrolle eingesetzt, besteht die Gefahr, dass sich schwach CD117-positive GIST immunnegativ verhalten.

2. Cyclin D1

- Die Expression von Cyclin D1 kann in Mantelzell-Lymphomen niedrig sein, hingegen in benignen Drüsen des Mammaparenchyms stark positiv
- Gleiche Problematik: wird benignes Mammaparenchym zur Validierung des Ak oder als interne Positivkontrolle genommen, können Mantelzell-Lymphome als negativ fehlinterpretiert werden.

3. CD10

- Die Expression von CD10 ist in follikulären Lymphomen niedriger als in manchen Karzinomen.
- Wird ein follikuläres Lymphom zur Validierung genommen, kann die Expression z. B. in
- Nierenzellkarzinomen oder Gallengängen beim hepatozellulären Karzinom zu stark und nicht mehr auswertbar sein.

Anmerkung 16:

Wenn das Gewebe anschließend gestanzt wird, sollte bei Tumorgewebe eine erneute immun-histochemische Färbung die Eignung als Positivkontrolle bestätigen.

Die Überwachung der Qualität der Positivkontrollen im Laufe der Zeit (einzelne Antigene gehen in zu früh vorgefertigten Schnitten verloren) muss sichergestellt werden.

3.5.6 Dokumentation und Archivierung von Validierungsdaten

3.6 Weitere Qualitätssicherungsmaßnahmen

4 Mitgeltende Unterlagen