

Handreichung für die Verwendung von Kontrollmaterial in der Molekularpathologie

(Stand Oktober 2023)

Dieses Dokument entstand aus einer Initiative der AG Molekularpathologie in der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und dient molekularpathologischen Laboren als Unterstützung bei der Umsetzung der IVDR in Bezug auf Kontrollmaterial. Das Dokument ist nicht rechtsverbindlich, spiegelt den aktuellen Wissensstand zum Zeitpunkt der Erstellung wider und hat keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die Autor*innen übernehmen keinerlei Haftung.

Nach Inkrafttreten der europäischen Verordnung für In-vitro-Diagnostika (IVDR) am 25. Mai 2017 sind die IVDR-Anforderungen mit einer fünfjährigen Übergangszeit ab dem 26. Mai 2022 verpflichtend umzusetzen.

Artikel 2 der IVDR beschreibt ein „In-vitro-Diagnostikum“ (IVD) als ein Medizinprodukt, das als Reagenz, Reagenzprodukt, Kalibrator, Kontrollmaterial, Kit, Instrument, Apparat, Gerät, Software oder System - einzeln oder in Verbindung miteinander - vom Hersteller zur *in-vitro* Untersuchung von aus dem menschlichen Körper stammenden Proben, einschließlich Blut- und Gewebespenden, bestimmt ist.

Damit gilt auch das Kontrollmaterial als IVD. Gesundheitseinrichtungen haben weiterhin die Möglichkeit, „Produkte hausintern herzustellen, zu ändern und zu verwenden und damit - in einem nicht-industriellen Maßstab - auf die spezifischen Bedürfnisse von Patientenzielgruppen einzugehen, die auf dem angezeigten Leistungsniveau nicht durch ein gleichartiges auf dem Markt verfügbares Produkt befriedigt werden können“. Sie werden dadurch zum Hersteller von *in-house* IVDs (IH-IVDs) und müssen die Bedingungen aus Artikel 5, Absatz 5 einhalten. Wichtig ist, dass sobald ein kommerzielles CE-IVD-Kontrollmaterial nicht entsprechend der Zweckbestimmung (z.B. andere Tumorentität) eingesetzt wird, der Anwender zum Hersteller wird. Dieser muss dann die Anforderung der IVDR erfüllen und dokumentieren.

Eine Grundvoraussetzung für die Herstellung von Kontrollmaterial als IH-IVD ist die Etablierung eines QM-Systems. Dieses kann sich an der in Deutschland

einzuhaltenden RiliBÄK oder den in Laboratorien weithin verbreiteten Norm der DIN EN ISO 15189 orientieren. Für die Pathologie als Inspektionsstelle kann zusätzlich die DIN ISO 17020 herangezogen werden. Zudem muss ein Risikomanagementsystem etabliert sein, dies kann sich z.B. an den in Kliniken eingesetzten Normen wie der ISO 31000, in Laboratorien der ISO 22367 oder mit Bezug auf Medizinprodukte der ISO 14791 orientieren.

Laut Definition ist eine Kontrollprobe eine Laborprobe, die sowohl bei der Präzisionskontrolle als auch bei der Richtigkeitskontrolle zum Einsatz kommen kann¹. Ein Kontrollmaterial kann somit auch eine Patientenprobe sein, solange diese nach aktuellen ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung nach der Deklaration von Helsinki behandelt wird und eine Einverständniserklärung seitens der Patienten vorliegt. Laut Anhang VIII der IVDR (Klassifizierungsregeln) gilt: „Kontrollmaterialien mit quantitativen oder qualitativen zugeordneten Werten, die für einen spezifischen oder mehrere Analyten bestimmt sind, werden derselben Klasse zugeordnet wie das Produkt“. Gemäß Anhang I, Kapitel II: „Allgemeine Sicherheits- und Leistungsanforderungen der IVDR“ müssen auch für das Kontrollmaterial Daten zu Kalibrierungen, Qualitätskontrollen, Lagerung und der Haltbarkeit von Chargen dokumentiert sein. Das Kontrollmaterial sollte alle klinisch relevanten Marker bzw. Erreger abdecken.

Grundsätzlich gibt es zwei Szenarien, bei denen ein Kontrollmaterial eingesetzt werden kann: einerseits bei der Etablierung bzw. Validierung eines *in-vitro* Diagnostikums, andererseits bei der Produktüberwachung (z.B. als interne Kontrolle). Die Anforderungen hierfür unterscheiden sich. Bei der Etablierung bzw. Validierung sollte das Ausgangsmaterial des Kontrollmaterials möglichst dem des Patientenmaterials entsprechen (z.B., wenn die Patientenprobe in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE) ist, sollte das Kontrollmaterial ebenfalls FFPE Material sein oder wenn die Patientenprobe eine Liquid Biopsy ist, sollte auch das Kontrollmaterial eine Liquid Biopsy oder artifizielles Plasma sein). Bei der Produktüberwachung kann das Ausgangsmaterial des Kontrollmaterials von dem des Patientenmaterials abweichen, solange es den Anforderungen der IVDR entspricht.

Für die Verwendung von FFPE-Blöcken als Kontrollmaterial gibt es verschiedene Möglichkeiten (Abbildung 1). Einerseits kann ein bereits analysierter Block verwendet

werden, von welchem erst Schnitte und dann ein Extrakt angefertigt werden. Man kann aber auch die Schnitte von mehr als zwei Blöcken eines Falls kombinieren und einen gemeinsamen Extrakt herstellen. Als dritte Alternative kann eine Zelllinie mit der gewünschten Aberration oder dem entsprechenden Erreger etabliert werden. Um wieder auf das gleiche Ausgangsmaterial für die Etablierung bzw. Validierung zu gelangen, sollte die Zelllinie in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet werden. Von diesem FFPE-Zellblock können dann Schnitte und ein Extrakt angefertigt werden. Als vierte Möglichkeit bietet sich die Kombination der Extrakte aus Zelllinien-FFPE Block und/oder FFPE Block an.

Wichtig bei all diesen Optionen ist, dass bei der Verwendung des Kontrollmaterials bei visueller Veränderung des Materials ein neuer HE-Schnitt (Hämatoxylin-Eosin) geschnitten und gefärbt wird. Hierbei empfiehlt es sich, dass bei Kontrollmaterial, das über eine gewisse Zeit ohne Veränderungen angewendet wird (z.B. bei der Erregerdiagnostik), direkt so viel wie möglich geschnitten und extrahiert wird. Extrakte sollten aliquotiert und entsprechend gelagert werden für einen angemessenen Zeitraum und bei konstanten Ergebnissen mit definierten Parametern. Für Kontrollmaterialien, die in regelmäßigen Abständen aktualisiert werden müssen (z.B. bei der Parallelsequenzierung), empfiehlt es sich, nur eine begrenzte Anzahl an Schnitten und Extrakten herzustellen. Das fertige Kontrollmaterial für die Etablierung bzw. Validierung sollte immer mit einer unabhängigen Methode getestet werden. Dies kann intern erfolgen, z.B. mit einem anderen Genpanel oder extern, z.B. mit einem Partnerlabor oder über Ringversuche. Bei der Produktüberwachung reicht eine interne Validierung mit entsprechender Dokumentation der Ergebnisse aus, solange die Erfolgsparameter eingehalten werden.

Sowohl das Kontrollmaterial für die Etablierung bzw. Validierung als auch das zur Produktüberwachung sollte mit einer angemessenen Anzahl an Stichproben vor der ersten Verwendung überprüft werden. Dies kann sich an der DIN EN ISO 15189 oder DIN ISO 2859-1 orientieren. Zusätzlich müssen die Erfolgsparameter vorab definiert und das Ergebnis über ein entsprechendes Formblatt dokumentiert werden. Eine Re-Testung sollte kontinuierlich in regelmäßigen Abständen erfolgen.

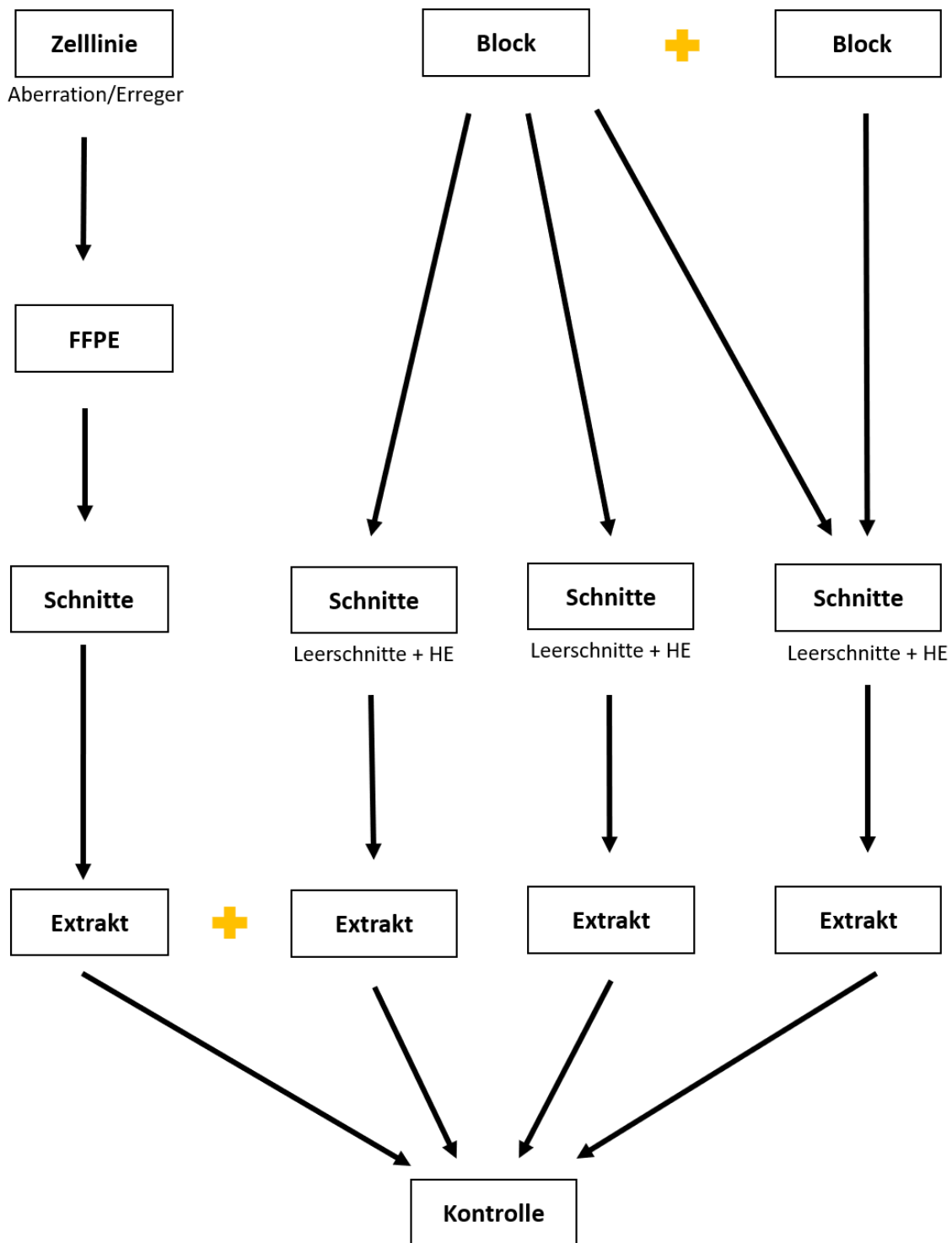


Abbildung 1: mögliche Herangehensweisen für die Herstellung von Kontrollmaterial.

Auch für die Etablierung und Validierung von Analysen an Liquid Biopsy Material kann Kontrollmaterial hergestellt werden. Hierbei kann eine Kombination von genomischer, randomisiert fragmentierter Wildtyp-DNA und (synthetischen) dsDNA Sequenzen, die die gewünschte molekulare Aberration aufweisen, genutzt werden. Hierbei ist darauf zu achten, dass das Kontrollmaterial ähnliche Allelfractionen der Varianten (<5% AF)

und Fragmentgrößen (maximaler Peak bei 160-170 bp) der natürlichen ctDNA aufweist.

Außerdem können insbesondere für die Produktüberwachung auch kommerziell erhältliche Kontrollen verwendet werden, die *research use only* (RUO) Produkte sind. Auch hier müssen die Anforderungen der IVDR umgesetzt und entsprechend dokumentiert werden wie z.B. Verifizierung des Kontrollmaterials, Einhaltung der Haltbarkeits- und Lagerbedingungen, Vergleich der Performance der Lot-Nummern, Erfüllung der grundlegenden Sicherheits- und Leistungsanforderungen, Qualitäts- und Risiko-Managementsystem.

Ab 26 Mai 2028 dürfen IH-IVDs, für die ein gleichwertiges CE-IVD Produkt auf dem Markt verfügbar ist, nicht mehr verwendet werden (Artikel 5.5.d). In Ausnahmen kann die Gesundheitseinrichtung in ihrer Dokumentation eine Begründung dafür liefern, dass die spezifischen Anforderungen nicht auf dem angezeigten Leistungsniveau durch ein gleichartiges auf dem Markt befindlichen CE-IVD befriedigt werden können. Bei Änderung der Lot-Nummer sollte eine Verifizierung vor Ort durchgeführt und dokumentiert werden.

Abkürzungen

IH:	in-house
IVD:	In-vitro- Diagnostikum
IVDR:	In Vitro Diagnostic Medical Devices Regulation; EU 2017/746
FFPE:	Formalin fixiertes, Paraffin eingebettetes Gewebe
HE:	Haematoxylin-Eosin
dsDNA:	Doppelsträngige DNA
cfDNA:	Zellfreie DNA (cell free DNA)
AF:	Allelfraktion
Bp:	Basenpaare
RiLiBÄK:	Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriums- medizinischer Untersuchungen
RUO:	Research use only

Referenzen:

¹ Qualitätskontrolle im Medizinischen Laboratorium von A bis Z – Ein Leitfaden in Schlagworten, 2. Aufl. Behring Diagnostika

Beteiligt an dieser Handreichung waren (alphabetische Reihenfolge):

L. Bohlmann, Molekulare Pathologie, Pathologisches Institut, Ludwig-Maximilians Universität München, München, Deutschland

I. Bratic-Hench, Molekulare Pathologie und Zytologie, Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel, Basel, Schweiz

Andreas Eckelt, IVDRconsulting UG, Niederkassel, Deutschland

T. Eder-Pinggera, Klinische Diagnostik, GIZ- gene im zentrum GmbH, St. Pölten, Österreich

S. Ehrhardt, Molekulare Diagnostik, Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Halle (Saale), Halle (Saale), Deutschland

L. Eßer, Molekulargenetik, Labor Dr. Wisplinghoff, Köln, Deutschland

K. Falkenberg, Molekularpathologie, Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Münster, Münster, Deutschland

S. Grenz, GENOPATH, überörtliche Teil-Berufsausübungsgemeinschaft für Molekularpathologie GbR, Bonn, Deutschland

K. Hartung, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Gießen, Deutschland

S. Herold, Molekularpathologie, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der Technischen Universität Dresden, Dresden, Deutschland

C. Huber, Molekularpathologie, GIZ- gene im zentrum GmbH, St. Pölten, Österreich

M.A. Ihle, Molekularpathologische Diagnostik, Institut für Pathologie, Medizinische Fakultät und Uniklinik Köln, Universität zu Köln, Köln, Deutschland

K. Ilm, Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie QuIP GmbH, Berlin, Deutschland

A. Kahles, Molekularpathologisches Zentrum, Pathologisches Institut, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, Deutschland

J. Kirfel, Molekularpathologie, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Lübeck, Deutschland

P. Lazar-Karsten, Molekularpathologie, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Lübeck, Deutschland

K. Maurus, Institut für Pathologie, Universität Würzburg, Würzburg, Deutschland

S. Merkelbach-Bruse, Molekularpathologische Diagnostik, Institut für Pathologie, Medizinische Fakultät und Uniklinik Köln, Universität zu Köln, Köln, Deutschland

N. Pelusi, Molekularpathologie, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn, Bonn, Deutschland

K. Rehm, GENOPATH, überörtliche Teil-Berufsausübungsgemeinschaft für Molekularpathologie GbR, Bonn, Deutschland

J. Schmidpeter, Teilgemeinschaftspraxis Molekularpathologie Südbayern, München, Deutschland

J. Sperveslage, Institut für Molekularpathologie, Münster, Deutschland

G. Vornberger, Institut für Pathologie, Universität Würzburg, Würzburg, Deutschland

F. Wilhelm, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel, Kiel, Deutschland

A.-L. Wulf, Molekularpathologie, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn, Bonn, Deutschland