

# **Masterarbeit**

## **Vergleich von drei verschiedenen Validierungsprozessen des Next Generation Sequencing im diagnostischen Setting zur Strategiefindung für das SMZ-Süd – Kaiser-Franz-Josef Spital unter Berücksichtigung der ISO 15189**

eingereicht von

**Vanessa Primmer, BSc.**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Master of Science**

**(MSc)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Institut für Pathologie Medizinische Universität Graz**

unter der Anleitung von Betreuer

Mag. Dr.phil. Karl Kashofer

Zöbing, 01.09.2019

### **Eidesstaatliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

# Inhalt

1.	Einleitung .....	10
1.1.	In-Vitro-Diagnostika-Verordnung.....	10
1.2.	Qualitätssicherung in diagnostischen Prozessen .....	11
1.3.	Zertifizierung .....	12
1.4.	Akkreditierung .....	13
1.4.1.	Validierung.....	13
1.4.2.	Verifizierung .....	14
1.4.3.	Ringversuche .....	15
1.4.4.	Beispiel Immunhistochemie .....	15
1.4.5.	Qualitätssicherung im Next Generation Sequencing.....	18
1.5.	Rationale.....	22
2.	Material und Methoden.....	23
2.1.	Probenauswahl .....	23
2.1.1.	Referenzproben.....	23
2.1.2.	Patientenproben Fa. Sophia Genetics .....	23
2.1.3.	Patientenproben gesamt.....	26
2.2.	DNA/RNA Isolierung, Quantifizierung, cDNA-Synthese .....	26
2.3.	Oncomine™ Focus Assay .....	26
2.4.	Next generation sequencing .....	27
2.5.	Bioinformatic pipelines .....	29
2.5.1.	IonReporter™ Software .....	29
2.5.2.	Fa. Sophia Genetics .....	32
2.6.	Referenzmethoden.....	33
3.	Ergebnisse .....	33
3.1.	Validierungsprozess Institut für Pathologie Graz .....	33
3.2.	Validierungsprozess Institut für Humangenetik Graz .....	35

3.3.	Validierungsprozess des KFJ-Spitals.....	35
3.3.1.	Allgemeine Qualitätssicherung .....	37
3.3.2.	Fa. Sophia Genetics .....	37
3.3.2.1.	Endbericht mit festgelegten Spezifikationen .....	38
3.3.2.1.1.	Analytische Sensitivität.....	38
3.3.2.1.2.	Analytische Spezifität .....	39
3.3.2.1.3.	Richtigkeit.....	39
3.3.2.1.4.	Präzision.....	39
3.3.2.1.5.	Wiederholbarkeit.....	40
3.3.2.1.6.	Reproduzierbarkeit.....	42
3.3.2.1.7.	Limit of detection .....	44
3.3.3.	IonReporter™ Software .....	44
3.3.4.	Festgelegte tumorrelevante Gene.....	49
3.3.5.	Befundung.....	50
3.3.6.	Erweiterung der Validierung auf 530er Chip .....	52
3.3.7.	Kostenaufstellung.....	52
4.	Diskussion.....	53
5.	Konklusion.....	55
	Literatur .....	56
	Anhang.....	61

## Abkürzungen

ASZK	Ambulanzselbstzahlerkatalog
BAM	Binary Alignment Map
CE	Conformité Européenne
CNV	Kopienzahlveränderung
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FN	false negative
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
IGV	Integrative Genome Viewer
Indels	Insertionen und Deletionen
ISO	Internationale Organisation für Normung
IVD	In-Vitro-Diagnostika
IVD-R	In-Vitro-Diagnostika-Verordnung
KAV	Krankenanstaltenverbund
KFJ-Spital	Kaiser-Franz-Josef Spital
NGS	Next Generation Sequencing
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
SNV	single nucleotide Variante
SP	well-defined (=gute Abdeckung)
TP	true positive
WT	Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich von Anreicherungsverfahren im NGS (29).....	20
Abbildung 2: Oncomine™ Focus Panel mit 52 Genen (39) .....	27
Abbildung 3: Klonale Amplifikation mittels Emulsions-PCR (40) .....	28
Abbildung 4: Validierungsprozess auf dem Institut für Pathologie in Graz .....	34
Abbildung 5: Konzept Validierungsprozess für das KFJ-Spital.....	36
Abbildung 6: Gegenüberstellung Richtigkeit und Präzision (42).....	40
Abbildung 7: Wiederholbarkeit (38) .....	42
Abbildung 8: Reproduzierbarkeit (38).....	43
Abbildung 9: Heterozygote KRAS Mutation (p.Gly12Arg) visualisiert im Integrative Genome Viewer.....	48
Abbildung 10: Befundbeispiel .....	51

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sampling-Strategie: Validierungslauf 1 (38) .....	24
Tabelle 2: Sampling-Strategie: Validierungslauf 2 (38) .....	24
Tabelle 3: Sampling-Strategie: Validierungslauf 3 (38) .....	25
Tabelle 4: Sampling-Strategie: Validierungslauf 4 (38) .....	25
Tabelle 5: Chipgrößen und Beladung des Ion Torrent™ Ion S5 (41).....	29
Tabelle 6: Richtwerte zur Qualitätskontrolle eines NGS-Laufs mit DNA-Proben (39) .....	30
Tabelle 7: Richtwerte zur Qualitätskontrolle eines NGS-Laufs mit RNA-Proben (39) .....	31
Tabelle 8: Richtwerte der SOPHiA DDM Pipeline für den Oncomine™ Focus DNA- Assay (38) .....	32
Tabelle 9: Richtwerte der SOPHiA DDM Pipeline für den Oncomine™ Focus RNA- Assay (38) .....	33
Tabelle 10: Detektierte Varianten aller Proben (38) .....	38
Tabelle 11: Detektierte Varianten der spezifizierten Proben (38) .....	38
Tabelle 12: Ergebnisse der festgelegten Kennzahlen in den einzelnen Validierungsläufen (38) .....	39
Tabelle 13: Ergebnisse der festgelegten Kennzahlen (38) .....	40
Tabelle 14: Ergebnis Sequenzier-Wiederholbarkeit (38) .....	41
Tabelle 15: Ergebnis Varianten-Wiederholbarkeit .....	41
Tabelle 16: Ergebnis Sequenzier-Reproduzierbarkeit (38).....	42
Tabelle 17: Ergebnis Varianten-Reproduzierbarkeit (38) .....	43
Tabelle 18: Ergebnisse der Kennzahlen Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit (38).....	44
Tabelle 19: Ergebnis tumorrelevanter Mutationen in Colon-/Leberkarzinomen ....	45
Tabelle 20: Ergebnis tumorrelevanter Mutationen in Melanomen .....	46
Tabelle 21: Ergebnis tumorrelevanter Mutationen in Lungenkarzinomen.....	46
Tabelle 22: Ergebnis tumorrelevanter Mutationen in gastrointestinalen Stromatumoren.....	46
Tabelle 23: Ergebnis tumorrelevanter Mutationen sonstiger Karzinome .....	47
Tabelle 24: Tumorrelevante Gene laut WHO-Klassifikation (43–47).....	50

## **Kurzzusammenfassung**

**Hintergrund:** Das Thema Qualitätssicherung in österreichischen Pathologien spielt zurzeit eine wichtige Rolle. Auf der einen Seite müssen in der Präzisionsmedizin und damit dem Versuch zu einer wirksamen Therapie eines einzelnen Patienten reproduzierbare und robuste Ergebnisse erzeugt werden, auf der anderen Seite verlangt die neue In-Vitro-Diagnostika-Verordnung (EU) 2017/746 die Erreichung der Akkreditierung EN ISO 15189:2012 bei Verwendung von nicht CE markierten Produkten. Deshalb ist ein korrekter Validierungsprozess, der ISO 15189 konform und unter Einhaltung aller relevanten Normen erstellt wird, zur Einführung des Oncomine™ Focus Assays im Kaiser-Franz-Josef-Spital von großer Bedeutung.

**Methode:** Zu Validieren gilt es den Oncomine™ Focus Assay der Firma ThermoFisher Scientific mittels der Next Generation Sequencing Technologie am Ion S5™ System. Dazu wurde eine externe Firma namens Sophia Genetics zur Unterstützung herangezogen. Diese hat vier Validierungsläufe hinsichtlich analytischer Sensitivität, analytischer Spezifität, Präzision, Genauigkeit, Wiederholbarkeit, Reproduzierbarkeit und Limit of Detection bewertet. Zusätzlich wurden hausintern weitere Proben analysiert, um auf eine Probenzahl von 105 zu kommen.

**Ergebnisse:** Der Assay konnte eine analytische Sensitivität von 96,25%, analytische Spezifität von 99,88%, Richtigkeit von 99,87% und Präzision von 72,64% erreichen. Die Sequenzier-Wiederholbarkeit beträgt 99,96%, die Varianten-Wiederholbarkeit 100%, die durchschnittliche Sequenzier-Reproduzierbarkeit 99,94% und die durchschnittliche Varianten-Reproduzierbarkeit 99,99% und weisen somit eine gute Sequenzier-Performance auf. Alle zusätzlichen Fälle stimmten zu 100% mit der Referenzmethode überein, es wurden höchstens zusätzliche wahrscheinlich pathogene Varianten detektiert.

**Konklusion:** Die Zusammenarbeit mit der Firma Sophia Genetics war erfolgreich, die Validierung konnte mit Einhaltung aller vorher definierten Spezifikationen der ISO 15189:2012 konform abgeschlossen werden und der Assay wurde schlussendlich in die Routinediagnostik des Kaiser-Franz-Josef-Spitals implementiert.

## **Abstract**

**Background:** The topic of quality assurance in Austrian pathologies currently plays an important role. On the one hand, reproducible and robust results must be produced in precision medicine and thus in the attempt to effectively treat a single patient. On the other hand, the new In Vitro Diagnostics Regulation (EU) 2017/746 requires accreditation of healthcare provider according to EN ISO 15189:2012 for the use of non CE marked products. Therefore, a correct validation process, compliant with ISO 15189 and in accordance with all relevant standards is of great importance for the introduction of the NGS based Oncomine™ Focus Assay in the Kaiser-Franz-Josef-Spital.

**Methods:** The Oncomine™ Focus Assay from ThermoFisher Scientific using the Next Generation Sequencing Technology is to be validated on the Ion S5™ System. This was supported by an external company called Sophia Genetics. The validation process evaluated four validation runs with regard to analytical sensitivity, analytical specificity, precision, accuracy, repeatability, reproducibility and limit of detection. In addition, further samples were analyzed exclusively in-house to arrive at a sample count of 105.

**Results:** The assay achieved analytical sensitivity of 96.25%, analytical specificity of 99.88%, accuracy of 99.87% and precision of 72.64%. The sequencing repeatability is 99.96%, the variable repeatability 100%, the average sequencing reproducibility 99.94% and the average variant reproducibility 99.99% and thus show a good sequencing performance. All additional cases were 100% consistent with the reference method, only additional probably pathogenic variants were detected.

**Conclusion:** The collaboration with the company Sophia Genetics was successful, the validation was completed in compliance with all previously defined specifications of ISO 15189:2012 and the assay was finally implemented into the routine diagnostics of the Kaiser-Franz-Josef-Spital.

# 1. Einleitung

## 1.1. In-Vitro-Diagnostika-Verordnung

Die neue In-Vitro-Diagnostika-Verordnung (IVD-R) (EU) 2017/746 tritt für bereits zugelassene Medizinprodukte nach einer fünfjährigen Übergangsfrist am 26.05.2022 in Kraft und soll zur Vereinheitlichung und Prozessanpassung von Zulassungsverfahren wie Inverkehrbringen, die Vermarktung und die Inbetriebnahme von In-vitro-Diagnostika (IVD) innerhalb der Europäischen Union (EU) dienen. Sie ist für alle EU-Länder in vollem Umfang umzusetzen und ersetzt die zurzeit aktuelle EU-Richtlinie über In-Vitro-Diagnostika (1).

Ein „In-vitro-Diagnostikum“ wird in der IVD-R definiert 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 und ausschließlich oder hauptsächlich dazu dient, Informationen zu einem oder mehreren der folgenden Punkte zu liefern: a) über physiologische oder pathologische Prozesse oder Zustände, (...)“ (1). Diese Definition trifft auf sämtliche Analysen auf österreichische Pathologien zu.

Eine grundlegende Neuheit in der Verordnung liegt darin, dass man Conformité Européenne (CE) gekennzeichnete Produkte verwenden muss, sofern diese für eine bestimmte Analyse/Methode vorhanden sind. Dieses ist in der IVD-R definiert: „CE-Konformitätskennzeichnung oder „CE-Kennzeichnung“ bezeichnet eine Kennzeichnung, durch die ein Hersteller angibt, dass ein Produkt den einschlägigen Anforderungen genügt, die in dieser Verordnung oder in anderen Rechtsvorschriften der Union über die Anbringung der betreffenden Kennzeichnung festgelegt sind“ Sie sollen die Konformitätsbeurteilung während einer Zertifizierung oder Akkreditierung später erleichtern (1). Da in der molekularpathologischen Abteilung bzw. im Next-Generation-Sequencing (NGS) kaum CE gekennzeichnete Produkte im Handel verfügbar sind, wird in Kap. II Art. 5 Abs. 5 die Verwendung von nicht CE markierten Produkten jedoch innerhalb von der Union ansässigen Gesundheitseinrichtungen unter Einhaltung mehrerer

Bedingungen genehmigt. Bedingungen für das Labor sind in etwa die Herstellung und Verwendung eines geeigneten Qualitätssystems und das Entsprechen der Norm EN ISO 15189. Außerdem ist eine Begründung für spezifische Erfordernisse der Patientenzielgruppe, also eine Fragestellung zur medizinischen Anwendung, notwendig und die Angabe des Leistungsniveaus, welches die Verwendung eines gleichartigen auf dem Markt befindlichen Produkts ausschließt. Die IVD-R stützt sich somit auf Qualitätsnormen aus der EN ISO 15189:2012 (D), weswegen die Erreichung einer Akkreditierung anzustreben ist oder das komplette Umstellen auf IVD-CE Tests notwendig ist (1). Die ÖNORM EN ISO 15189 gilt für klinische oder medizinische Labors weltweit als einheitlicher Standard für die Laborpraxis und wurde von internationaler Ebene in das österreichische Normenwerk übernommen.

## **1.2. Qualitätssicherung in diagnostischen Prozessen**

Das Thema Qualitätssicherung spielt in österreichischen Pathologien zurzeit eine wichtige Rolle und ist nicht mehr wegzudenken. Besonders in der Präzisionsmedizin und damit dem Versuch zu einer wirksamen Therapie eines einzelnen Patienten ist es von großer Bedeutung reproduzierbare und robuste Ergebnisse zu schaffen (2). Speziell wenn es um genetische Veränderungen geht, spricht man in der Präzisionsmedizin von einer enormen Entwicklung, da einige neue Therapien auf genetische Aspekte aufgebaut sind bzw. etliche Gendefekte bekannt sind, die mit spezifischen Tumortypen assoziiert werden. Falsch positive und negative Ergebnisse können hier fatale Auswirkungen haben (2).

Hier stellt sich nun die Frage, was Qualität überhaupt bedeutet. Der Begriff leitet sich vom lateinischen Wort „qualis“ ab und bedeutet „wie beschaffen“, was zunächst neutral und nicht messbar ist. Heutzutage ist das Wort jedoch oft eine positive oder negative Wertung eines Produktes, Systems oder Prozesses (3, 4). In der DIN EN ISO 9001:2015 (D) lautet die Definition wie folgt: „Qualität ist der Grad, in dem ein Satz inhärenter Merkmale Anforderungen erfüllt.“ Es wird also bestimmt, wie ein Merkmal, also ein Produkt, System oder Prozess, den vorausgesetzten Erwartungen oder auch Kundenanforderungen entspricht. Die Internationale Organisation für Normung (ISO) soll helfen, ein Qualitätsmanagementsystem einzuführen, um Gesamtleistungen einer

Organisation, in diesem Fall einer Gesundheitseinrichtung, zu steigern. Dieses System ist essenziell im Falle der Verwendung eines nicht CE markierten Produktes, um der oben erwähnten IVD-R zu entsprechen. Im Grunde bedeutet Qualitätsmanagement die Planung, Lenkung, Kontrolle und Verbesserung von Prozessen und Abläufen, um den gewünschten Qualitätsgrad eines Produktes oder Dienstleistung und dessen Reproduzierbarkeit zu erzielen (5). Weitere Vorteile eines funktionierenden Qualitätsmanagementsystems sind unter anderem die Erhöhung der Marktchancen, Steigerung von Gewinnen, das Ausbauen von strategischen Erfolgsfaktoren und die Steigerung der Prozessleistung (5).

Wie wichtig die Implementierung eines funktionierenden Qualitätsmanagementsystems ist, zeigt auch eine Studie von Kinns H, et al. Sie beschreibt, dass fehlerhafte Befunde zwischen 2,7% und 13% vom Labor ausgehen, wobei der größte Teil davon im prä- und postanalytischen Bereich passiert, aber trotzdem 7% bis 13% dieser Fehler ihren Ursprung in der analytischen Phase haben (6).

Die IVD-R gibt jedoch vor, dass die EN ISO 9001:2015 (D) nicht ausreichend ist, sondern das Entsprechen der Norm EN ISO 15189, welche einer Akkreditierung entspricht, erforderlich ist (1). Dazu ist die Begriffsklärung zwischen Zertifizierung und Akkreditierung notwendig.

### **1.3. Zertifizierung**

Die Definition für Zertifizierung lautet: „Das Verfahren bzw. das Ergebnis des Verfahrens, bei dem einem Unternehmen bestätigt wird, dass es über ein Qualitätsmanagement-System verfügt, das den DIN-EN-ISO-Normen 9000 - 9004 entspricht. (3)“ Der Zertifizierungsprozess muss von einem unparteiischen Dritten erfolgen, welcher aufzeigt, dass angemessenes Vertrauen darin besteht, dass ein ordnungsgemäß bezeichnetes Erzeugnis, Verfahren oder Dienstleistung in Übereinstimmung mit einer bestimmten Norm oder einem anderen normativen Dokument ist (1, 5, 7). Dies bedeutet also, dass nur das Vorhandensein eines Qualitätsmanagementsystems überprüft wird, nicht aber die Kompetenz in einem medizinischen Laboratorium.

## **1.4. Akkreditierung**

Im Gegensatz zur Zertifizierung bedeutet die Akkreditierung eine „Bestätigung durch eine dritte Seite, die formal darlegt, dass eine Konformitätsbewertungsstelle die Kompetenz besitzt, bestimmte Konformitätsbewertungsaufgaben durchzuführen“. Das heißt, eine Akkreditierung überprüft und bestätigt zusätzlich auch die Fachkompetenz und Qualität eines Systems oder Person und nicht nur die Existenz eines Qualitätsmanagementsystems (1, 5, 7).

Wie oben beschrieben, ist eine Akkreditierung für das Pathologisch-bakteriologische Institut des Kaiser-Franz-Josef (KFJ)-Spitals nicht mehr wegzudenken, da in Zuge des Kap. 2 Abs. 2 Art. 5 der IVD-R auf Anhang I hingewiesen wird. In diesem Anhang werden wichtige Leistungsmerkmale bei der Verwendung von Produkten aufgelistet, die an die ÖNORM EN ISO 15189:2012 (D) angelehnt sind und dort wiedergefunden werden. Diese sind unter anderem Leistungsmerkmale der Analyseleistung wie analytische Sensitivität/Spezifität, Richtigkeit, Präzision, Genauigkeit, Nachweis- und Quantifizierungsgrenze, Messbereich, Linearität und Cut-Off und der klinischen Leistung wie diagnostische Sensitivität/Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert, Likelihood-Verhältnis und erwartete Werte bei nicht betroffenen und betroffenen Bevölkerungsgruppen (1, 7). Die Spezifikation der relevanten Leistungsmerkmale für einzelne Analysen muss im Laufe der Validierung stattfinden. Im Folgenden werden wichtige Abschnitte der EN ISO 15189:2012 (D) beschrieben.

### **1.4.1. Validierung**

Die Definition zur Validierung lautet: „Bestätigung durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die Anforderungen für einen spezifischen beabsichtigten Gebrauch oder eine spezifische beabsichtigte Anwendung erfüllt worden sind (7)“. Hervorzuheben ist dabei, dass immer eine Fragestellung für die medizinische Anwendung einer Methode notwendig ist. Eine Validierung ist laut ISO15189 außerdem für jedes Untersuchungsverfahren durchzuführen, welches i) nicht genormt ist, ii) für das Laboratorium gestaltet oder entwickelt ist, iii) ein Standardverfahren ist, aber außerhalb des vorgesehenen Anwendungsbereichs

benutzt wird oder iv) validiert und anschließend modifiziert worden ist und ist zur Erreichung der Akkreditierung unausweichlich (7).

In diesen Bereich fällt auch die Notwendigkeit der Validierung diverser kommerziell erhältlicher Panels für molekularpathologische Untersuchungsverfahren wie das Next Generation Sequencing, welche im Fall des KFJ-Spitals somatische Varianten detektieren soll.

Zu Beginn einer Validierung werden meist kommerziell erhältliche Referenzkontrollen verwendet, um eine große Spannweite an Varianten zu testen. Es muss jedoch darauf geachtet werden, dass die Kontrollen mit den später verwendeten Patientenproben in der Routine vom Typ her vergleichbar sind, wie später im Kapitel Qualitätssicherung in der Immunhistochemie erwähnt wird (8).

Ziel einer Validierung ist die Bestätigung, dass der getestete Assay verlässlich ist und man über Limitationen und Unsicherheiten Bescheid weiß. Alle relevanten Mutationen sollen detektiert werden können. Der ganze Prozess muss strikt dokumentiert werden und die relevanten Leistungsmerkmale sollen für alle Probenotypen und deren relevanten Varianten nachvollziehbar sein. Außerdem müssen alle Gene des verwendeten Assays eine bestimmte Lesetiefe erreichen können, welcher Wert auch in der Validierung festgelegt werden muss (8, 9). Wird nur ein Teil des gesamten Prozesses verändert, ist eine Revalidierung notwendig, um die Verlässlichkeit des Assays weiterhin bestätigen und aufrechterhalten zu können (10). Außerdem ist eine regelmäßige Kontrolle durch Ringversuche oder Vergleich mit externen Partnerlabors vorgesehen (7). Wird ein neuer Assay eingeführt, dessen Prozess sich zum Beispiel in der Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Isolierung, Libraryherstellung, etc. überschneidet, ist nur noch eine Teilvalidierung, wie Abdeckung der im Kit enthaltenen Gene, notwendig.

### **1.4.2. Verifizierung**

Im Gegenzug dazu wird die Verifizierung als „Bestätigung durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass festgelegte Anforderungen erfüllt worden sind“ definiert (7). Das bedeutet, dass auch CE gekennzeichnete und validierte Produkte von Verfahrensentwicklern einer Verifizierung unterzogen werden müssen, solange diese im Gebrauch nicht verändert werden. Alle

Leistungsmerkmale, die vom Erzeuger vorgegeben wurden, müssen eingehalten und bestätigt werden. Wie bei der Validierung müssen alle Schritte des Verfahrens dokumentiert und aufbewahrt werden (7).

### **1.4.3. Ringversuche**

Sowohl die österreichische Gesellschaft für Pathologie als auch Normungsorganisationen für Zertifizierungen und Gesetzestexte sehen eine Teilnahme an Ringversuchen zur externen Qualitätssicherung vor (1, 7, 11, 12). Ziel ist es, präanalytische, analytische und postanalytische Maßnahmen mit einem Ringversuch zu einer Analyse abzudecken. Das Verfahren und Ergebnis müssen regelrecht dokumentiert und abgelegt werden. Proben der Ringversuche sollten außerdem so nah wie möglich am Patientenmaterial und der klinischen Fragestellungen des Labors angelegt sein, um die Ergebnisse vergleichbar zu machen und interpathologische Schlüsse ziehen zu können (7). Am pathologisch-bakteriologischen Institut des KFJ-Spitals werden externe Firmen wie NordiQC für die Immunhistochemische Qualitätskontrolle, INSTAND für Bereiche der Molekulargenetik, Bakteriengenom-, Pilzgenom-, Parasiten- und Virusgenomnachweise und EQA Schemes der European Society of Pathology für Mutationsnachweise herangezogen. Verwendet werden Nativproben, lyophilisierte Proben, DNA-Proben sowie Paraffinproben. Damit ist auch die DNA-Isolierung abgedeckt.

### **1.4.4. Beispiel Immunhistochemie**

Um an einem Beispiel die Wichtigkeit von Qualitätssicherung darzustellen, kann man die Immunhistochemie heranziehen, die eng mit der Genetik im Zusammenhang steht. Hier sind Positiv- und Negativkontrollen aufgrund der Problematik der Variabilität der Antikörper bzw. Sonden und damit eine oft unzureichende Reproduzierbarkeit unabkömmlich und lässt sich auf präanalytische, analytische und postanalytische Faktoren zurückführen. Diese sind unter anderem die Gewebspräparation, deren Fixierung, Reagenziendiversität, unterschiedliche Färbemethoden, Scoring-Systeme und Definitionen, wann ein Ergebnis als positiv einzustufen ist. All diese Faktoren lassen eine entsprechende Qualitätssicherung noch wichtiger erscheinen (13, 14).

Die österreichische Gesellschaft für Pathologie hat deswegen Qualitätsstandards festgelegt, die unter anderem die Mitführung von Positiv- und Negativkontrollen empfehlen (15). Die Wahl angemessener Kontrollen müssen dem Gewebetyp und der Antikörpersonde angepasst werden. Die Studie von Kinns H, et al. definiert eine Kontrolle als angemessen, wenn die Zusammensetzung dem Probenmaterial so ähnlich wie möglich ist (6).

Da die Gewebspräparation und Fixierung hier eine große Rolle spielen, ist es von Vorteil interne Kontrollen zu bevorzugen. Hier können zum Beispiel Normal- und Tumorgewebe vom selben Patienten und am selben Gewebestück beurteilt werden (15). Ein Beispiel dafür ist am pathologisch-bakteriologischen Institut im Kaiser-Franz-Josef Spital das hereditäre non-polypöses kolorektales (HNPCC) oder auch Lynch-Syndrom, welches durch autosomal dominant vererbte Mutationen der DNA-Mismatch-Reparatur-Gene verursacht wird. Die betroffenen Proteine sind MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 und können mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden (16). Durch den Ausfall eines oder mehrerer Proteine werden 1-7% aller kolorektaler Karzinome verursacht, da ihre Funktion darin besteht, Fehler während der Replikation durch die DNA-Polymerase zu beheben und zu korrigieren. Beim Ausfall dieser wichtigen Funktion bleibt es jedoch an beiden DNA-Strängen bei der Mutation und dadurch zur Anhäufung genetischer Veränderungen, Ausfall des Proteins und somit zur Entstehung eines Karzinoms (17, 18). Da das Zielprotein im Tumorgewebe nicht exprimiert wird, entsteht keine immunhistochemische Reaktion. Da die Proteine im Normalgewebe jedoch normal vorhanden sind, bestätigt die immunhistochemische Färbung dort, dass der Vorgang funktioniert hat und das Ergebnis bewertet werden kann.

Bei der Verwendung von Antikörpern an Proteine, die im Normalgewebe jedoch nicht exprimiert werden und die Antigene nur tumorspezifisch vorkommen, müssen externe Kontrollen verwendet werden. Das HER-2 Gen kodiert für den Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), welcher eine wichtige Rolle bei der Regulation von grundlegenden biologischen Prozessen wie Zellwachstum, -überleben oder -differenzierung spielt (19). In Tumorzellen kommen in 20% bis 30% der Brustkrebsfälle eine Kopienzahlveränderung (CNV) vor, welche meist

auch in einer Überproduktion des Rezeptors endet. Dies hat zur Folge, dass das Karzinom meist eine schlechtere Prognose hat als ein HER2 negativer Tumor, jedoch bekommt der Patient eine Trastuzumab-Antikörpertherapie, welche gute Wirkung spezifisch gegen die Tumorzellen mit der Genamplifikation zeigt (20, 21). Wird Trastuzumab jedoch bei Patienten ohne HER2-Amplifikation eingesetzt, kann die Therapie schaden, da ein ähnlicher Rezeptor ebenso im gesunden Herzgewebe lokalisiert ist. Wenn die eingesetzten Antikörper dort binden, kann dies zu Kardiotoxizität führen (22). Das ist der Grund, warum die richtige Beurteilung des HER2-Status enorm wichtig ist und unbedingt eine Kontrolle mitzuführen ist.

Der Rezeptor liegt an der Zellmembran, was ein wichtiges Kriterium zum Ausschluss einer Antikörper-Antigen-Reaktion darstellt. Man unterscheidet die Ergebnisse in 0, 1+, 2+ und 3+, wobei 0 und 1+ keine oder schwache Färbung aufweisen und negativ sind und 3+ eine vollständige, basolaterale oder lateral membranöse Reaktion in >10% der Tumorzellen aufweist und positiv ist (23, 24). Das Ergebnis 2+ kann eine unvollständige, schwächere Färbung in >10% der Tumorzellen oder eine vollständige Färbung in <10% der Tumorzellen sein und muss durch eine zweite Methode ergänzt werden. Dazu verwendet man eine In-situ-Hybridisierung, welche eine spezifische Bindung des HER-2 Gens mittels einer Gensonde bedeutet. Die Reaktionen können nun vom Pathologen ausgezählt werden (24). Die Studie von Ngo et al. unterstreicht noch einmal die Wichtigkeit einer guten externen Kontrolle am gleichen Schnitt, da die Variabilität des Antikörpers oft sehr hoch ist und die interpathologischen Testergebnisse schwanken. Es wird die Mitnahme einer 2+ und 3+ Kontrolle empfohlen, um die beiden Ergebnisse besser interpretieren zu können, welches in weiterer Folge eine wichtige Entscheidung in der Therapiegabe darstellt (20, 25).

Zusätzlich zu internen und externen Kontrollen unterscheidet man noch zwischen Kontrollen auf separatem Objektträger und einer on-slide-Kontrolle. Bei erstgenannter Kontrolle wird pro Antikörper ein Testobjektträger pro Lauf mitgeführt, um die Funktion des Antikörpers zu testen. Für heikle Interpretationen wie HER2 ist jedoch eine on-slide-Kontrolle zu bevorzugen (15).

### **1.4.5. Qualitätssicherung im Next Generation Sequencing**

Qualitätssicherung für das Next Generation Sequencing (NGS) im diagnostischen Setting ist zurzeit Thema in vielen Publikationen. Es wird nach verschiedenen Möglichkeiten zur Standardisierung des Prozesses von der Präanalytik bis hin zur Befundung gesucht. Herausfordernde Punkte sind unter anderem die verschiedenen Instrumenten-Plattformen, Reagenzien und Bioinformatik Pipelines und unterschiedlichste Kombinationen davon. Reagenzien der einen Plattform führen zum Beispiel zu anderen Sequenzlängen, Laufzeit, Endqualität, etc (26, 27). Speziell auf Basis dieser Ergebnisse muss ein Labor sich entscheiden, welche Sequenzierplattform gekauft werden soll. Soll ein hoher „Turn-around“ gewährleistet sein ist IonTorrent vorteilhaft, für eine hohe Datenmenge wie bei der Genom- oder Exomsequenzierung ist Illumina zurzeit Marktführer. Zusätzlich muss jedes Institut die Entscheidung treffen, ob es Panels selbst zusammenstellt oder kommerziell erhältliche Panels erwirbt, welche für diagnostische Labors ohne Forschungshintergrund eine gute Option darstellen (8, 28).

Diese Arbeit wird sich auf kommerziell erhältliche zielgerichtete NGS-Panels beschränken, da im KFJ-Spital das selbstständige Evaluieren eines Panels die Kapazitäten weit überschreiten würden. Außerdem werden auf der Pathologie nur somatische Mutationen untersucht, Applikationen für Keimbahnmutationen wären anders spezifiziert und bräuchten andere Panels zur Abklärung. Auf dem Markt gibt es für somatische Mutationen zurzeit ein weites Spektrum an Panels für diverse Arten von Tumoren, wie zum Beispiel für solide Tumore oder hämatologische Tumore. Der Vorteil besteht darin, dass eine große Anzahl an diversen Tumoren oder Indikationen zeitgleich abgewickelt werden können, da ein Panel viele Gene und sogenannte hotspot Regionen beinhaltet und dies führt wiederum zu Kostenminimierung und Zeitersparnis (29). Unterschieden wird bei den zielgerichteten Anreicherungen zwischen der Hybrid Capture- und Amplikonanreicherung,(siehe Abbildung 1) welche verschiedene Qualitätskriterien zur Folge haben (29).

Die Anreicherung von Zielsequenzen für das NGS mittels Amplikons basiert auf einer Multiplex Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), welche danach mit

probenspezifischen sogenannten Barcodes und plattformabhängigen Adaptern ligiert werden. Ein limitierender Faktor dieser Methode ist das Ausfallen einer kompletten Region, wenn eine Variante auf der Primerzielsequenz liegt, da die Amplifikation dann nicht stattfinden kann. Die Konsequenz ist eine zu geringe Leserate oder ein falsch negatives Ergebnis, welches es unbedingt zu verhindern gilt. Deshalb ist die Lage der Primer ein wichtiger Faktor beim Paneldesign (29).

Bei der Hybrid Capture Methode werden spezifische biotinylierte Hybridisierungssonden verwendet, welche komplementär zu einer spezifisch ausgewählten Region am Genom sind. Sie sind signifikant länger als herkömmliche Primer die in PCR's verwendet werden und brauchen nicht die gleiche hohe Übereinstimmungsrate. Dies ist notwendig, um auch Sequenzen mit Varianten in den gewünschten Regionen zu binden. Ein Vorteil gegenüber der Amplikonmethode ist, dass die erzeugten Fragmente länger sind und sensible Regionen unmittelbar in der Nähe der gebundenen Sonde mit angereichert werden, welche bei den hochspezifischen Primern Probleme machen könnten. Auf der anderen Seite werden auch oft benachbarte, isolierte Regionen amplifiziert, die nicht gewünscht sind. Dies wiederum verringert die Lesetiefe in wichtigeren Regionen. Schwer zu anreichernde Zielsequenzen können mit einer Erhöhung der Sondenanzahl im Kit erhöht werden. Anschließend an die die Hybridisierung der Sonden an die Zielsequenz werden die Fragmente an Streptavidin Magnetkügelchen gebunden, daraufhin gewaschen, eluiert, mit spezifischen Adaptern und Barcodes ligiert, amplifiziert und schlussendlich sequenziert. Die Adapter Ligation und anschließende Anreicherung der verschiedenen großen DNA-Stränge benötigt mehr Zeit im Gegensatz zur Amplikon-basierten Methode, ist mit größerem Aufwand verbunden und zusätzlich mit viel höheren Kosten verbunden (29).

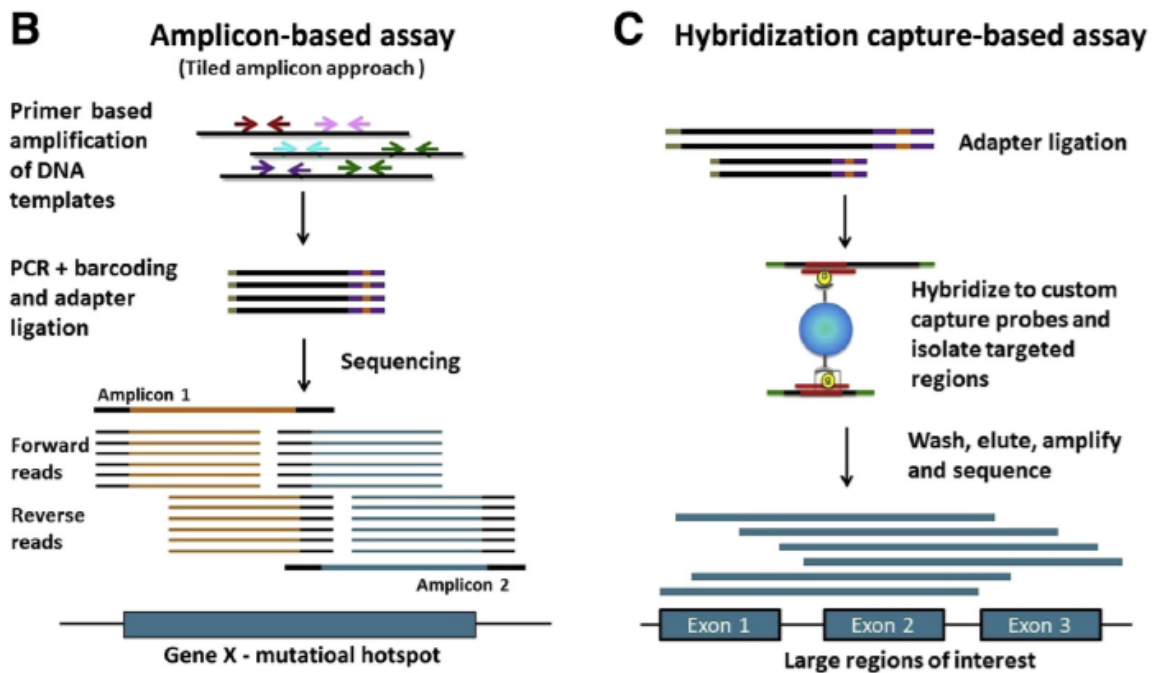


Abbildung 1: Vergleich von Anreicherungsverfahren im NGS (29)

Die Qualitätsansprüche bei NGS-Anwendungen im klinischen Setting sind generell sehr hoch, da das Endprodukt schnell, vertrauensvoll und reproduzierbar sein sollte. Die Schwierigkeit dabei besteht in den vielen Einzelschritten, wie Probenbereitstellung, Bibliotheksherstellung, Sequenzierung und Datenanalyse. Wie oben beschrieben, erschweren verschiedene Kombinationen aus Instrumente, Reagenzien und bioinformatische Pipelines eine Standardisierung zur Qualitätssicherung (29). Aus diesem Grund ist es notwendig den kompletten Prozess zu validieren (7, 11).

Eine der größten Herausforderung stellt im NGS die bioinformatische Datenanalyse dar. Diese beginnt mit Rohsequenz des Sequenziergeräts und endet mit der Varianten Annotation. Schon zu Beginn kann man einschätzen wie die Qualität der Rohsequenz ist, was notwendig ist, um zum Beispiel Sequenziermethoden und Plattformen zu vergleichen. Dazu verwendet man meistens den sogenannten Phred score, welcher die Wahrscheinlichkeit angibt, dass eine Base falsch sequenziert wurde und ist in den meisten Pipelines schon integriert. Die Werte können zwischen vier und 60 liegen, wobei man bei >30 von einem guten Wert spricht. Er bedeutet, dass die Base zu 0,001% falsch eingebaut wurde (30, 31).

Darauf folgt das Alignment der entstandenen reads an ein Referenzgenom. Bevorzugt wird noch das Genome Reference Consortium GRCh37 (entspricht human genome hg19) mit der Veröffentlichung im Februar 2009 eingesetzt und ist immer anzugeben. Mit dem NGS produziert man ungefähr reads in der Länge von 80 bis 200 bp. Je länger diese sind, desto sicherer können sie an die richtige Stelle im Referenzgenom zugeteilt werden. Problematisch sind Homopolymere, repetitive Regionen oder homologe Gene, da die erzeugten reads an mehrere Stellen im Genom gemappt werden könnten. Paired-end-reads werden gerne eingesetzt, um Fehler beim Mapping zu vermeiden. Diverse Programme können mittels dieser Informationen auch einen Qualitätswert berechnen. Der Alignment-Algorithmus, welcher bestimmt wie strikt ein read an die Referenz mappen muss und wieviele Abweichungen zugelassen werden, variiert außerdem je nach angewandter NGS-Methode. Um single-nucleotide Varianten (SNVs) zu finden, muss zum Beispiel nur eine Abweichung erlaubt werden. Dann könnten jedoch Insertionen oder Deletionen von mehreren Basen übersehen werden, also muss eine gewisse Abweichung immer erlaubt werden, da diese auch von hoher klinischer Relevanz sein könnten.

Eine weitere Möglichkeit für einen Qualitätswert bei Hybrid basierten Methoden ist die Detektion von reads außerhalb der angereicherten Sequenzen, wodurch sich die ungefähre Sequenzierfehlerrate berechnen lässt (8, 32, 33). Zusätzlich spielt die Sequenziertiefe bei beiden Methoden eine große Rolle. Auch dieser Wert wird je nach Sequenziermethode gewählt und variiert enorm bei Applikationen für somatische Mutationen und Keimbahnmutationen. Beim „Variant calling“ gilt, je öfter eine Variante detektiert wurde, desto wahrscheinlicher ist das Ergebnis. Ein zusätzlicher Qualitätsparameter ist hier der Vergleich der Varianten mit Datenbanken wie dbSNP. Der Wert von Polymorphismen der Probe und Polymorphismen der Datenbank sollte bei 95% Übereinstimmung liegen. Ein Vergleich mit Proben der gleichen Ethnie ist auch immer sinnvoll (8, 34).

Nun müssen alle Varianten annotiert werden, um entscheiden zu können ob diese für die Probe relevant sind. Dazu müssen zunächst falsch positive Varianten gefiltert werden. Diese können durch Desaminierung bei Formalin fixierten Paraffin eingebetteten (FFPE)-Proben oder Homopolymeren entstehen (35). Besonders

bei der IonTorrent Technologie wird oft ein Problem hinsichtlich Homopolymere beschrieben, dieses soll jedoch durch Verbesserungen der Variant Caller bei bis zu acht gleichen Basen in Abfolge besser in den Griff bekommen sein und durch Kontrolle im Integrative Genome Viewer (IGV) auszuschließen (8, 36). Auch die Minimierung der Desaminierung ist durch Zugabe von Uracil-DNA Glycosylase vor der Amplifikation der Probe möglich (37). Zuletzt müssen die bestätigten Varianten interpretiert werden und dazu gibt es einige Möglichkeiten. Zum Beispiel können hotspot Regionen an relevanten Genen gezielt angeschaut werden, oder die mögliche Veränderung der Proteincodierung (missense oder stille Mutation). Oft werden hier Datenbanken mit häufig beschriebenen Varianten herangezogen, welche besonders bei somatischen Mutationen und spezifischen Tumoren sehr hilfreich sein können und mittels spezifischer Filter in der Pipeline schnell abrufbar sein. (10, 34).

Viele Firmen wie in unserem Fall Sophia Genetics bieten auf der Ebene der Qualitätssicherung Unterstützung, um Instituten zu helfen neue Methoden oder Panels zu etablieren oder die Qualität von bereits eingeführten Untersuchungen zu halten und zu überprüfen. Vor allem für Institute ohne Forschungs- und Entwicklungskapazitäten ist es von großer Bedeutung hier Unterstützung zu bekommen, da auch gebrauchsfertige Panels validiert werden müssen(8).

## **1.5. Rationale**

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Validierung des Oncomine™ Focus Assays auf der Sequenzierplattform der Firma (Fa.) Thermo Fisher Scientific™ am S5™ System am pathologisch-bakteriologischen Institut des KFJ-Spitals. Ziel der Arbeit ist die Modell-Entwicklung eines Validierungsprozesses, welcher alle Kennzahlen und Normen zur Erreichung der Akkreditierung EN ISO 15189:2012 (D) berücksichtigt. Hierfür werden drei verschiedene Validierungsprozesse verglichen und deren Vor- und Nachteile erörtert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Probenauswahl

#### 2.1.1. Referenzproben

Insgesamt wurden vier Referenzproben zur Qualitätssicherung verwendet, welche unabhängig von Labor, Instrumenten- und Assayplattform und Bediener einheitliche Testergebnisse gewährleisten müssen. Die *AcroMetrix™ Oncology Hotspot Control* (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) enthält mehr als 500 Mutationen aus der Datenbank Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) mit unterschiedlichen Variantenarten und somit Nukleotidlängen in 53 verschiedenen Genen. Sie enthält bereits extrahierte DNA, die als unabhängige Probe zur Bibliotheksherstellung mitzuführen ist. Als quantitative DNA Kontrolle wurde die *Quantitative Multiplex Reference Standard gDNA HD701* (Horizon, Cambridge, UK) verwendet, welche die Hauptgene *BRAF*, *KIT*, *EGFR*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA* und deren Allelfrequenzen zwischen 0,8% und 24,5% umfasst. Die SG060 Kontrolle entspricht der *Quantitative Multiplex Reference Standard FFPE HD200* (Horizon, Cambridge, UK), welche die gleichen Hauptgene und Allelfrequenzen wie die HD701 Kontrolle enthält. Hier werden jedoch zusätzlich die DNA-Isolierungsschritte kontrolliert. Die mitgeführte SG063 Kontrolle wurde aufgrund Lieferungsproblemen aus der Versuchsreihe ausgeschlossen und wird daher nicht näher beschrieben.

Zur Qualitätskontrolle der RNA wurde die *5 Fusion RNA Multiplex Positive Control HD796* (Horizon, Cambridge, UK) herangezogen. Das Material ist FFPE Gewebe, wodurch das Aufreinigungsprocedere, die reverse Transkription und anschließende Bibliotheksherstellung mit überprüft werden. Enthalten sind 5 relevante Fusionen: *EML4(13)-ALK(20)*, *CCDC6(1)-RET(12)*, *SLC34A2(4)-ROS1(32)*, *TPM3(7)-NTRK1(10)* und *ETV6(5)-NTRK3(15)*.

#### 2.1.2. Patientenproben Fa. Sophia Genetics

Im Zuge des Validierungsprogramms mit der Fa. Sophia Genetics wurden vier Läufe mit dem Ion 520™ Chip Kit mit insgesamt 20 Proben geplant, die mittels

Sampling-Strategie jeweils vor dem kommenden Lauf festgelegt wurden. In folgenden Tabellen 1 bis 4 werden die verwendeten Proben aufgelistet. Beinhaltet sind Referenzproben sowie anonymisierte Routineproben aus dem KFJ-Spital. Außerdem wurden inter-run und intra-run Wiederholungen durch die Firma festgelegt.

Step 1 Run1						
	Sample	Name	Barcode	Type	Comments	
Oncomine Focus S5 520	1	Reference Sample	5G063	001	DNA	For inter-run
	2	Sample 1	2474_18	002	DNA	For inter-run
	3	Sample 2	4329_18	005	DNA	For inter-run
	4	Sample 3	3844_17	003	DNA	
	5	Sample 3	3844_17	004	DNA	Intra-run replicate
	6	Sample 4	2260_18	006	DNA	
	7	Sample 5	Akkrometrix Hotspot control	007	DNA	Inter-run replicate to pre-run

Tabelle 1: Sampling-Strategie: Validierungslauf 1 (38)

Step 1 Run2				520 chip		
	Sample	Name	Barcode	Type	Comments	
Oncomine Focus S5 520	1	Sample 5	Akkrometrix Hotspot control	001	DNA	inter-run
	2	Sample 1	2474_18	002	DNA	inter-run
	3	Sample 2	4329_18	003	DNA	inter-run
	4	Sample 6	5482_18_1	004	DNA	
	5	Sample 6	5482_18_1	005	DNA	intra-run replicate
	6	Sample 7	5569_18	006	DNA	
	7	Reference Sample	HD 701	007	DNA	

Tabelle 2: Sampling-Strategie: Validierungslauf 2 (38)

Step 2 Run 3						
	Sample	Name	Barcode	Type	Comments	
Oncomine Focus S5 520	1	Reference sample	HD 701	007	DNA	Inter-run replicate
	2	Reference sample	HD 796	001	RNA	
	3	Sample 8	ALK KO1	002	DNA	ALK fusion
			*	008	RNA	
	4	Sample 9	ALK KO2	003	DNA	ALK fusion
			*	009	RNA	
	5	Sample 10	5765_18	004	RNA	BCR-ABL Fusion
	6	Sample 11	H 5689_18	005	DNA	Amplification Her2
			*	010	RNA	
7	Sample 12	H 14160_18	006	DNA	Amplification Her2	
			011	RNA		
8	Reference Sample	SG063	012	DNA	New sample	
9	Reference Sample	SG060	013	DNA		

Tabelle 3: Sampling-Strategie: Validierungslauf 3 (38)

Step 2 Run 4						
	Sample	Name	Barcode	Type	Comments	
Oncomine Focus S5 520	1	Sample 13	4721_14	001	DNA	
	2	Sample 14	4723_14	002	DNA	
	3	Sample 15	53_19	003	DNA	
	4	Sample 16	57_19	004	DNA	
	5	Sample 17	59_19	005	DNA	
	6	Sample 18	61_19	006	DNA	
	7	Sample 19	458_17	007	DNA	
	8	Sample 20	554_17	008	DNA	
	9	Reference sample	HD769	009	RNA	Inter-run replicate
	10	Sample 8	ALK KO1	010	RNA	Inter-run replicate
	11	Sample 9	ALK KO2	011	RNA	Inter-run replicate

Tabelle 4: Sampling-Strategie: Validierungslauf 4 (38)

Die DNA-Proben 15 bis 18 wurden von der Validierung ausgeschlossen, da es sich hier um liquid biopsy Proben handelt und diese nicht für den Oncomine Focus

Assay geeignet sind. Außerdem mussten die RNA-Proben 10 – 12 ausgeschlossen werden, da das ABL-Gen nicht im verwendeten Assay amplifiziert wird bzw. die Validierung der Kopienzahlveränderungen nicht im Validierungsvertrag beinhaltet waren.

### **2.1.3. Patientenproben gesamt**

Zusätzlich zu den gewünschten Proben von der Fa. Sophia Genetics wurden zufällig gewählte, archivierte DNA-Proben mit bekannten Mutationen aus den Jahren 2014 bis 2019 sequenziert, um auf eine Gesamtzahl von 105 zu kommen wie in den Tabellen 19 bis 23 im Kapitel Ergebnisse ersichtlich ist. Die vier Referenzproben sind hier nicht miteinberechnet.

## **2.2. DNA/RNA Isolierung, Quantifizierung, cDNA-Synthese**

Die DNA und RNA Isolierung aus FFPE-Material erfolgte mittels dem automatisierten MagNA Pure Compact Instrument (Roche, Austria). Dazu wurden der MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I und MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit verwendet. Die Konzentrationen wurden danach mittels Qubit 4 Fluorometer (ThermoFisher Scientific, Deutschland) und deren hoch sensitiven Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit und Qubit™ RNA HS Assay Kit gemessen.

Um die folgende Amplikonsequenzierung auch für die RNA durchführen zu können, muss diese in cDNA umgewandelt werden. Das erfolgte mittels reverser Transkriptase mit dem SuperScript™ VILO™ Master Mix von Invitrogen (Deutschland).

## **2.3. Oncomine™ Focus Assay**

Der Oncomine™ Focus Assay von ThermoFisher Scientific (Deutschland) wird zur Detektion relevanter Mutationen in 52 Genen für solide Tumore eingesetzt. Möglich ist die gleichzeitige Detektion von sogenannten „hotspot“ Mutationen in DNA sowie RNA. Verschiedene Varianten wie SNVs, kleine Insertionen und Deletionen (Indels), Kopienzahlveränderungen (CNVs) und Genfusionen (siehe Abbildung 2) können in einem Lauf analysiert werden. Während im DNA-Assay alle tumorrelevanten Loci amplifiziert und sequenziert werden, sind die Primer im

RNA-Assay so gesetzt, dass bei negativem Ergebnis nur ein paar Kontrollgene amplifiziert werden. Nur wenn die Probe tatsächlich eine Fusion enthält, findet eine Amplifikation statt, da die Primer auf beide Driver-Gene gesetzt wurden. Durch die geringe Anzahl an erzeugten reads muss die RNA nicht bei der Größenauswahl der diversen Chips beachtet werden (39).

Hotspot genes (35 genes)		Copy number genes (19 genes)		Gene fusions (23 genes)	
<i>AKT1</i>	<i>IDH2</i>	<i>AKT1</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>ABL1</i>	<i>PDGFRA</i>
<i>ALK</i>	<i>JAK1</i>	<i>ALK</i>		<i>AKT3</i>	<i>PPARG</i>
<i>AR</i>	<i>JAK2</i>	<i>AR</i>		<i>ALK</i>	<i>RAF1</i>
<i>BRAF</i>	<i>JAK3</i>	<i>BRAF</i>		<i>AXL</i>	<i>RET</i>
<i>CDK4</i>	<i>KIT</i>	<i>CCND1</i>		<i>BRAF</i>	<i>ROS1</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>KRAS</i>	<i>CDK4</i>		<i>EGFR</i>	
<i>DDR2</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>CDK6</i>		<i>ERBB2</i>	
<i>EGFR</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>EGFR</i>		<i>ERG</i>	
<i>ERBB2</i>	<i>MET</i>	<i>ERBB2</i>		<i>ETV1</i>	
<i>ERBB3</i>	<i>MTOR</i>	<i>FGFR1</i>		<i>ETV4</i>	
<i>ERBB4</i>	<i>NRAS</i>	<i>FGFR2</i>		<i>ETV5</i>	
<i>ESR1</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>FGFR3</i>		<i>FGFR1</i>	
<i>FGFR2</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>FGFR4</i>		<i>FGFR2</i>	
<i>FGFR3</i>	<i>RAF1</i>	<i>KIT</i>		<i>FGFR3</i>	
<i>GNA11</i>	<i>RET</i>	<i>KRAS</i>		<i>MET</i>	
<i>GNAQ</i>	<i>ROS1</i>	<i>MET</i>		<i>NTRK1</i>	
<i>HRAS</i>	<i>SMO</i>	<i>MYC</i>		<i>NTRK2</i>	
<i>IDH1</i>		<i>MYCN</i>		<i>NTRK3</i>	
		<i>PDGFRA</i>			

Abbildung 2: Oncomine™ Focus Panel mit 52 Genen (39)

## 2.4. Next generation sequencing

Auf der Pathologie des SMZ-Süds – KFJ-Spital hat man sich aufgrund des notwendigen schnellen „turn-around“ und das Einsetzen von kommerziell erhältlichen Kits für den Ion Torrent™ Ion S5 von der Fa. ThermoFisher Scientific entschieden.

Das Prinzip der Ion-Torrent™-Technologie beruht im Gegensatz zu den meisten anderen Technologien nicht auf Fluoreszenzmessung, sondern auf Basis von pH-Veränderungen. Diese entstehen durch Abspaltung eines Protons nach dem Einbau der einzelnen Nukleotide, wodurch keine teuren Kameras oder Laser

benötigt werden. Auch die Bibliotheksherstellung und klonale Amplifikation variiert von Hersteller zu Hersteller. In Folge sollen nur die Anwendungen für IonTorrent beschrieben werden.

Unter Verwendung des Oncomine™ Focus Assays von ThermoFisher Scientific (Deutschland) wird das Prinzip der Amplikonsequenzierung angewandt. Hier werden zunächst mehrere spezifische Abschnitte der DNA mittels Multiplex-PCR amplifiziert, bevor man das PCR-Produkt mit dem Fu-Pa Reagenz behandelt, um die Primer partiell zu verdauen und die Enden der Amplikons zu phosphorylieren. Danach werden an die Amplikons die Adaptoren P und A inklusive eines spezifischen Barcodes (Ion Xpress™ Barcode Adapters von ThermoFisher Scientific) pro Patienten ligiert und mittels Agencourt AMPure XP von Beckman Coulter (Austria) längenspezifisch aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wird die fertige Bibliothek, auch Library genannt, mit einer qPCR mittels Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit von ThermoFisher Scientific (Deutschland) vermessen, gepoolt und das Ion Chef™ Instrument wird beladen, um die Emulsions-PCR und Halbleiterchip-Beladung automatisiert durchführen zu können. Die Schwierigkeit bei Emulsions-PCR liegt in der richtigen Konzentration der Library, da in der Theorie sich in jedem Wassertropfchen im Öl genau ein Bead und ein DNA-Molekül befinden soll, um im Anschluss an die klonale Amplifikation ein monoklonales Produkt zu erhalten, welches essenziell für eine richtige Auswertung ist. Wenn kein Bead, kein DNA-Molekül oder mehr als nur eins der jeweiligen Komponenten in einem Kügelchen vorhanden sind, kommt es entweder zu keiner Amplifikation, zu polyklonalen Produkten oder Duplikaten. Diese Möglichkeiten werden zum Teil in Abbildung 3 dargestellt (40).

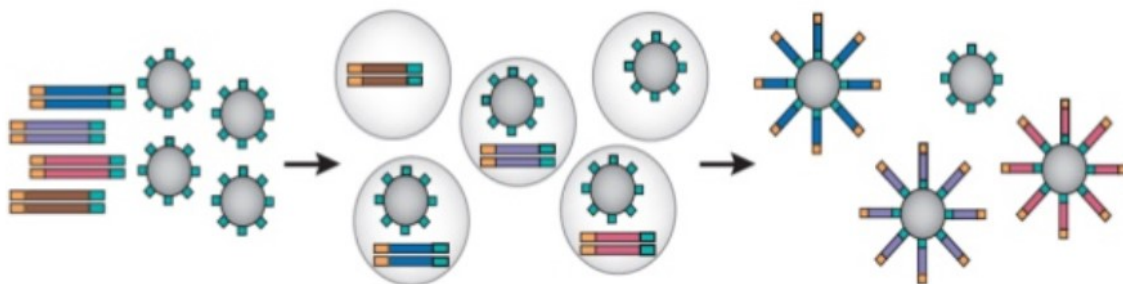


Abbildung 3: Klonale Amplifikation mittels Emulsions-PCR (40)

Weiters erfolgt die Sequenzierung bis 200 bp am Hochdurchsatz Sequenziergerät von IonTorrent, welches auf kleinere Panels und niedrigeren Durchsatz optimiert ist. Die Bedienung wird durch das Einsetzen gebrauchsfertiger Kartuschen vereinfacht und trotzdem flexibel. Ein Vorteil besteht darin, verschiedene Chip-Größen verwenden zu können. In der folgenden Tabelle 5 ist ersichtlich welche Menge an reads bei welcher Chipgröße produziert werden können und wieviele Proben man beladen kann. Die Angaben gelten nur für den Oncomine™ Focus Assay. In der Validierung wurden nur die Größen 510, 520 und 530 getestet. Die Angaben zur Probenbeladung gelten nur für DNA-Input, da Fusionen bei RNA-Input nur sehr wenige reads für eine ausreichende Befundung erzeugen. Es gibt nur ein paar Kontrollgene die amplifiziert werden müssen, ansonsten findet nur bei einer Fusion eine Amplifikation statt, da die Primer so designt sind, dass sie diese spezifischen Stellen am Gen umgeben. Man kann also als Beispiel einen Ion 520 Chip mit acht Proben mit DNA als Ausgangsmaterial und zusätzlich 8 Proben mit RNA als Ausgangsmaterial beladen (41).

<b>Ion 510 Chip</b>	<b>Ion 520 Chip</b>	<b>Ion 530 Chip</b>	<b>Ion 540 Chip</b>	<b>Ion 550 Chip</b>
<b>2-3M reads</b>	<b>4-6M reads</b>	<b>15-20M reads</b>	<b>60-80M reads</b>	<b>100-130M reads</b>
<b>4 Proben</b>	<b>8 Proben</b>	<b>26 Proben</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>

*Tabelle 5: Chipgrößen und Beladung des Ion Torrent™ Ion S5 (41)*

Die bioinformatische Filterung und die technische und medizinische Auswertung hängen jeweils von der verwendeten Analysen-Pipeline ab. Hier finden das „base calling“, „reads alignment“, Varianten Identifikation und Varianten Annotation statt, wessen Qualitätssicherung in der Einleitung beschrieben wurde. Die Interpretation der Varianten wird vom Pathologen durchgeführt.

## **2.5. Bioinformatic pipelines**

### **2.5.1. IonReporter™ Software**

Im Gegensatz zu der später beschriebenen Pipeline von der Fa. Sophia Genetics, ist die Pipeline für den Oncomine™ Focus Assay in der IonReporter™ Software

nur über einen lokalen Server am Institut abrufbar. Wie bei der Fa. Sophia Genetics hat das gesamte Team der molekularpathologischen Abteilung des KFJ-Spitals eine umfangreiche Einschulung von der Fa. ThermoFisher Scientific spezifisch für den Oncomine™ Focus Assay erhalten. Im Zuge der Einschulung wurden Kriterien zur Qualitätssicherung empfohlen, welche während des gesamten Validierungsprozesses beobachtet wurden und sich bewahrheitet haben. In der Routine werden alle Kriterien, welche in der Tabelle 6 und Tabelle 7 aufgelistet sind, der Reihe nach durchgenommen. Zu unterscheiden sind der DNA-Assay und der RNA-Assay, da andere Arten an Mutationen entscheidend sind, wie weiter oben schon beschrieben wurde (39).

<b>DNA Hotspot Mutationen</b>	
<b>Allgemeine Informationen pro CHIP</b>	<b>Richtwerte</b>
ISP Density	gleichmäßiger, roter Kreis mit blauem Rand
ISP Loading	≥95%
ISP Enrichment	≥99%
Clonal	≥60%
Final Library	≥90%
Aligned Bases	≥98%
Mean Raw Accuracy 1x	≥99%
Alignment Quality (Mean Coverage Depth [x])	≤0.1
<b>Probenspezifische Informationen</b>	
Reads	>300 000
Mean Read Length	≥110 bp
Read Length Histogram	geringe Streuung/keine Linksverschiebung
Mapped Reads	>300 000
Reads On Target	≥90%
Reads' Mean Depth	≥1200
Reads Uniformity	>95%
<b>Coverage Analyses Report (probenspezifisch)</b>	
Amplicons with at least 500 reads	100%
Amplicons reading end-to-end	≥95%
<b>CNVs</b>	
Geschlechtsangabe	
Tumorprozentzahl	>50%
MAPD	<0,5 (Streuung der Amplikonanreicherung)
Ergebnis	>4
Filter	<b>Oncomine Focus 5%</b> <b>No Call</b>

Tabelle 6: Richtwerte zur Qualitätskontrolle eines NGS-Laufs mit DNA-Proben (39)

Zu unterscheiden sind systematische Fehler, die man vor allem bei „Allgemeine Informationen pro CHIP“ erkennen kann, aber auch bei den „Probenspezifischen Informationen“, wenn zum Beispiel ein bestimmtes Gen bei allen Proben nicht amplifiziert werden konnte. Diese Fehler sind zuerst auszuschließen, da es die

vollständige Wiederholung des Laufs zur Folge hat. Probenspezifische Fehler können leichter gehandhabt werden, indem eine einzelne Bibliothek der problematischen Probe wiederholt wird. Alle Werte sind strikt einzuhalten, außer „Amplicons with at least 500 reads“. 500 reads sind, wie schon öfter erwähnt, das Minimum der Sequenziertiefe bei somatischen Mutationen. Wenn ein paar Gene darunter liegen, kann man einzeln beurteilen, ob sie für den spezifischen Tumor nun wirklich relevant wären. Ansonsten kann man den Befund trotzdem abschließen. Wichtig ist, dass man zusätzlich zum vorgefertigten Filter (ThermoFisher Scientific) „OncoPrint Focus 5%“ immer einen Blick auf die sogenannten „No Calls“ wirft. Das sind Varianten, die aufgrund mangelnder Qualitätswerte nicht als sichere Variante gefiltert worden sind. Diese Regionen müssen im IGV händisch angeschaut und beurteilt werden, da sich eine wichtige Variante verstecken könnte (39).

Bei den CNVs ist im Gegensatz zu den Hotspot- bzw. Punktmutationen zusätzlich zu beachten, dass das Ergebnis nur aussagekräftig ist, wenn der Tumorgehalt bei >50% liegt und das Ergebnis >4 beträgt, da andernfalls keine Therapierelevanz besteht (39).

Folgende Tabelle 7 weist auf, dass bei der RNA-Analyse nicht so viele Richtwerte einzuhalten sind. Detektiert man ein *MET* „Exon skipping“, das heißt ein oder mehrere Exons werden nicht transkribiert, sind mehrere Werte zu beachten. Betragen die total mapped reads mehr als 150.000 und die Probe weniger als 500 reads für das exon skipping, wird von einem falsch positiven Ergebnis ausgegangen (39).

<b>RNA</b>	
<b>Probenspezifische Informationen</b>	<b>Richtwerte</b>
<b>Mean Read Length</b>	<b>80-100 bp</b>
<b>Total Mapped Reads</b>	<b>&gt;5000</b>
<b>Fusionsschwellenwert</b>	<b>&gt;20</b>
<b>bei MET exon skipping</b>	<b>&gt;120 (auf Relation zu total reads achten)</b>
<b>Expressionskontrollen</b>	<b>present (&gt;2)</b>
<b>Filter</b>	<b>Default Fusion View</b>

Tabelle 7: Richtwerte zur Qualitätskontrolle eines NGS-Laufs mit RNA-Proben (39)

Bei Nichteinhalten der Richtwerte muss für jede Probe einzeln diskutiert werden und die Konsequenzen für das Ergebnis besprochen werden. Folgen dafür sind entweder das Wiederholen der einzelnen Probe, solange kein systematischer Fehler zu erkennen ist. Ist jedoch die Lesetiefe betroffen und es kann keine Coverage von 500 reads an einer bestimmten Position erreicht werden, ist es die Entscheidung des Pathologen, ob das Gen tumorrelevant ist oder es ausgeschlossen werden kann. Dies hat keine Wiederholung zur Folge.

## 2.5.2. Fa. Sophia Genetics

Die Pipeline der Fa. Sophia Genetics wurde im Zuge des Validierungsverfahrens in einige Schritte zusammengefasst. Für die Analyse müssen die Rohdaten mittels Binary Alignment Map (BAM)-Dateien in die Software SOPHiA DDM geladen werden. Die Qualitätswerte werden nicht von ThermoFisher Scientific übernommen, sondern unabhängig noch einmal berechnet. Das gleiche gilt für Alignment, variant calling und Annotation. Auch von der Fa. Sophia Genetics wurden Richtwerte festgelegt, die in der Pipeline automatisch umgesetzt werden und in der Tabelle 8 und Tabelle 9 dargestellt werden (38). Der Unterschied zur IonReporter™ Software werden hier gleich alle Varianten aufgelistet, mit dem Hinweis, wenn es sich um eine low-coverage Variante handelt. Auch hier gibt es die Möglichkeit, eine Zielregion direkt am IGV zu visualisieren.

<b>DNA</b>	
<b>Variant calling</b>	<b>Richtwerte</b>
Phred score	>10
Minimum depth	30x
Minimum number of supporting reads	10x
<b>Annotation</b>	
Verschmelzen von Varianten	innerhalb 5 bp
low confidence Varianten	1. Variantenfraktion <5% bei SNPs und Indels 2. Indels bei Homopolymeren ≥5 3. Off-Target Varianten 4. Coverage <500x
<b>Filter</b>	<b>selbst erstellbar</b>

Tabelle 8: Richtwerte der SOPHiA DDM Pipeline für den Oncomine™ Focus DNA-Assay (38)

<b>RNA</b>	
<b>Probenspezifische Informationen</b>	<b>Richtwerte</b>
Total Mapped Reads	keine Angabe
Fusionsschwellenwert	>100
Expressionskontrollen	present
<b>Filter</b>	<b>selbst erstellbar</b>

Tabelle 9: Richtwerte der SOPHiA DDM Pipeline für den OncoPrint™ Focus RNA-Assay (38)

## 2.6. Referenzmethoden

Die Ergebnisse der NGS-Validierungsläufe wurden mit Referenzmethoden verglichen, die im KFJ-Spital bis dato in der Routinediagnostik in Verwendung und implementiert waren. Die Gene *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* und *EGFR* wurden mit diversen Kits für real-time PCR der Firma Roche am Cobas z480 Analyser verglichen (*KRAS* Mutation Test v2 (LSR); *BRAF/NRAS* Mutation Test (LSR) und *EGFR* Mutation Test v2). *ALK* und *ROS1* Fusionen wurden mittels einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit Sonden der Firma ZytoVision GmbH (Deutschland) verglichen (ZytoLight® SPEC *ALK* Dual Color Break Apart Probe und ZytoLight® SPEC *ROS1* Dual Color Break Apart Probe). Die Gene *KIT* und *PDGFRA* wurden mittels Sanger Sequenzierung und selbst designten Primern analysiert (siehe Anhang). Die Abdeckung der restlichen Gene wurde mittels bioinformatischer Methoden von der Fa. Sophia Genetics kontrolliert.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Validierungsprozess Institut für Pathologie Graz

Der Validierungsprozess am Institut für Pathologie an der Medizinischen Universität in Graz, dargestellt in Abbildung 4, soll für jegliche Abteilungen wie Immunhistochemie, Histologie, Molekularpathologie und Elektronenmikroskopie gültig sein, weshalb er allgemein gehalten ist und nicht auf Spezifikationen eingeht. Diese werden spezifisch für die zu validierende Untersuchung ausgewählt und bearbeitet. Die drei wesentlichen Schritte sind das Erstellen eines Testplans und -berichts, die Durchführung und Überprüfung der gewählten Leistungsmerkmale und die darauffolgende Freigabe durch die Laborleitung.

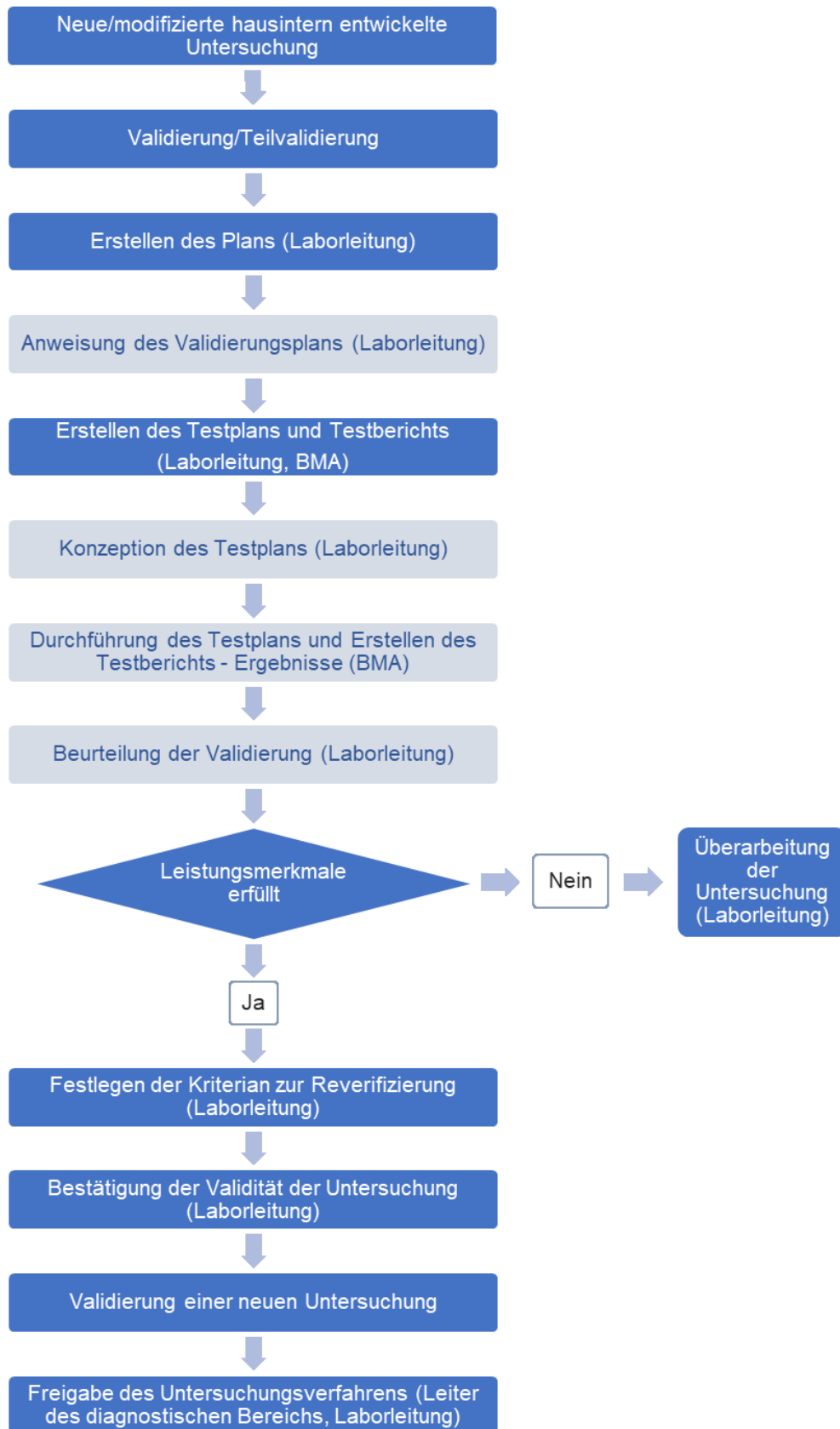


Abbildung 4: Validierungsprozess auf dem Institut für Pathologie in Graz

### **3.2. Validierungsprozess Institut für Humangenetik Graz**

Der Validierungsprozess bezogen auf das NGS sieht für das Institut für Humangenetik an der Medizinischen Universität in Graz prinzipiell so aus, dass die Spezifikationen von der Fa. Illumina als vorgegebene Werte herangezogen werden. Dazu wurden auf der einen Seite bekannte interne Proben verwendet, auf der anderen Seite auch standardisierte DNA von Coriell Institute for Medical Research gekauft. Weiters werden für die Verifizierung laufend Vergleiche mit Partnerlaboratorien durchgeführt und einzelne Parameter der zu validierenden/verifizierenden Methode mittels Ringversuchen mit dem Anbieter EMQN abgedeckt.

### **3.3. Validierungsprozess des KFJ-Spitals**

Da es für einen selbstständigen Validierungsprozess im KFJ-Spital an Expertise gefehlt hat, entschied man sich einen externen Partner zur Unterstützung hinzuzuziehen. Für die Validierung des OncoPrint™ Focus Assays wurde ein Vertrag mit der Fa. Sophia Genetics abgeschlossen, um uns zum Beispiel in der Verarbeitung der bioinformatischen Daten und Aufstellung der Statistiken zu helfen.

Die Probenauswahl gestaltete sich aus anonymisierten Proben verschiedener Tumorentitäten aus den Jahren 2014 bis 2019 aus dem KFJ-Spital und empfohlenen Referenzproben. Die Auswertung der ersten vier Sequenzierläufe wurden von Sophia Genetics begleitet, aber auch mit der IonReporter™ Software abgeglichen.

Nach Erfüllung aller Leistungsmerkmale erfolgte abschließend die schriftliche Bestätigung der Validität der gesamten Analyse von der Laborleitung im KFJ-Spital und die Einführung in die Routinediagnostik des molekularpathologischen Labors.

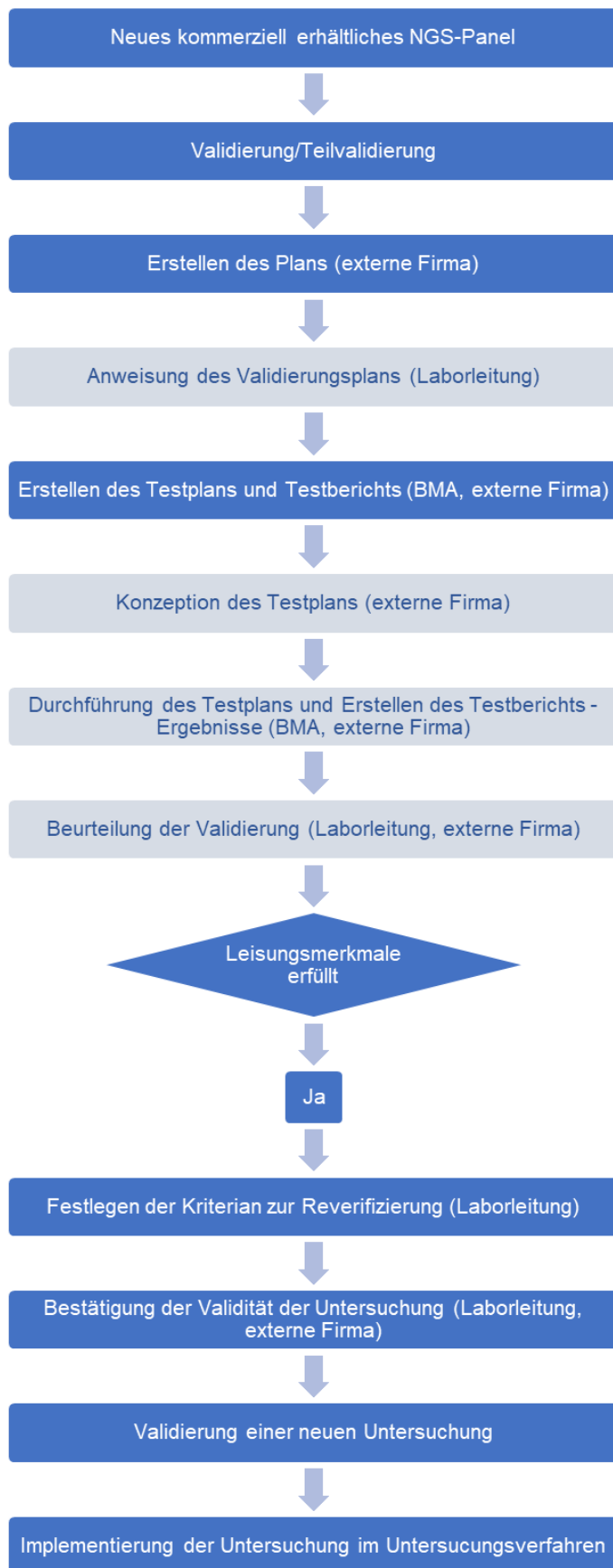


Abbildung 5: Konzept Validierungsprozess für das KFJ-Spital

### **3.3.1. Allgemeine Qualitätssicherung**

Folgende Parameter sind für den zu validierenden Test von der Fa. ThermoFisher Scientific festgelegt worden, welche sich während der Validierungsphase bewährt haben und vom KFJ-Spital eingehalten wurden. Nach jedem Einzelschritt kann die Qualität der einzelnen Proben bestimmt werden und mit ihr die Entscheidung, ob die Probe weiterverarbeitet werden kann oder ein Schritt wiederholt werden muss. Nach der Entscheidung, dass eine molekularpathologische Untersuchung mittels NGS-Analyse durchgeführt werden soll, muss der Pathologe im Falle eines FFPE-Materials den Tumorzellgehalt festlegen. Dieser Wert darf 10% nicht unterschreiten, da die Sensitivität bei 5% liegt und somatische Mutationen auch heterozygot detektiert werden müssen. Nach der DNA-Isolierung wird die DNA Konzentration bestimmt. Diese darf 1 ng/µl nicht unterschreiten, da sonst die regelrechte Amplifikation nicht gewährleistet werden kann. Nach der Bibliotheksherstellung wird die fertige Library mittels qPCR vermessen, wobei der Mindestwert 50pM beträgt. Wurde dieser nicht erreicht, ist eine erneute Libraryherstellung notwendig. Die weiteren Werte zur Qualitätssicherung sind pipelinespezifisch anzuwenden und wurden im Kapitel 2.3 festgelegt.

### **3.3.2. Fa. Sophia Genetics**

Durch die Unterstützung der Fa. Sophia Genetics in der Einführung der analytischen Performance von genetischen Tests wurde eine schnelle Etablierung in die Routinediagnostik ermöglicht. Dazu legt sie vorgefertigte Sampling-Strategien und deren Referenzproben fest, überlässt dem Kunden jedoch die Auswahl der Proben mit bekannten Mutationen. Nach jedem der vier Läufe werden die Ergebnisse besprochen und Verbesserungsvorschläge gegeben. Das Programm beinhaltet außerdem eine bioinformatische Einschulung der Pipeline von Sophia Genetics.

Ziel der Validierung war es, bekannte tumorrelevante Mutationen in soliden Tumoren zu bestätigen und bei den restlichen Genen eine Abdeckung von 500 reads zu erreichen, welche für somatische Mutationen notwendig ist. Die tumorrelevanten Gene in den einzelnen Entitäten waren in den bisher verwendeten Referenzmethoden für kolorektale Karzinome *KRAS*, *BRAF* und

*NRAS*; für Melanome *BRAF*, *NRAS* und *KIT*, für Lungenkarzinome *EGFR*, *ALK* und *ROS1* und für gastrointestinale Stromatumoren *KIT* und *PDGFRA*.

### 3.3.2.1. Endbericht mit festgelegten Spezifikationen

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der einzelnen Läufe hinsichtlich Variantendetektion aller Proben aufgelistet (38).

Die Markierungen 6 und 7 deuten auf die Abwesenheit der Mutation *PIK3CA* (NM\_006218: c.323G>A + c.331A>G) in der AcroMetrix™ Oncology Hotspot Control hin, obwohl die Anreicherung an dieser Stelle in Ordnung ist (38).

Run	# of Samples	SNP			INDEL		
		TP	FN	EV	TP	FN	EV
Run_1	3	129	2 <sup>6</sup>	79	12	0	1
Run_2	3	145	3 <sup>7</sup>	95	13	0	2
Run_3	3	56	2	131	2	0	6
Run_4	3	3	0	71	0	0	1

Tabelle 10: Detektierte Varianten aller Proben (38)

Die Tabelle 11 ergibt sich nur aus den spezifizierten Proben, welche zur Berechnung der einzelnen Spezifikationen herangezogen wurden (38).

Run	# of Samples	SNP			INDEL			TN
		TP	FN	FP	TP	FN	FP	
Run_1	0	0	0	0	0	0	0	
Run_2	1	18	1 <sup>2</sup>	0	1	0	0	18
Run_3	3	56	2 <sup>3</sup>	27 <sup>4</sup>	2	0	2 <sup>5</sup>	25215
Run_4	0	0	0	0	0	0	0	

Tabelle 11: Detektierte Varianten der spezifizierten Proben (38)

#### 3.3.2.1.1. Analytische Sensitivität

Als Definition der analytischen Sensitivität gilt der Prozentsatz von bestätigten Varianten, die mittels der neuen Methode richtig als positiv eingestuft wurden und wurde von der Fa. Sophia Genetics mittels der Formel  $\frac{TP}{(TP+FN)} * 100$  berechnet. Für den zweiten Lauf errechnet sich das Ergebnis also wie folgt:  $\frac{19}{(19+1)} * 100 = 95\%$ . TP bedeutet „true positive“ und FN bedeutet „false negative“. Wie in den Tabelle

12 und Tabelle 13 zu sehen ist wurde die Sensitivität für den gesamten Validierungsprozess und die einzelnen Läufe berechnet. Das erforderliche Ergebnis von mindestens 95% wurde in allen Fällen erreicht (38).

	Run_1	Run_2	Run_3	Run_4
Sensitivity	NA%	95%	96.66%	NA%
Specificity	NA%	100%	99.88%	NA%
Accuracy	NA%	97.36%	99.87%	NA%
Precision	NA%	100%	66.66%	NA%

Tabelle 12: Ergebnisse der festgelegten Kennzahlen in den einzelnen Validierungsläufen (38)

### 3.3.2.1.2. Analytische Spezifität

Als Definition der analytischen Spezifität gilt wiederum der Prozentsatz von negativen bzw. Wildtyp Positionen, die als richtig negativ eingestuft wurden. Die Formel der Fa. Sophia Genetics lautet:  $\frac{TN}{(TN+FP)} * 100$ . Um wieder den Lauf zwei als Beispiel heranzuziehen, wird die Spezifität wie folgt errechnet:  $\frac{18}{(18+0)} * 100 = 100\%$ . TN bedeutet „true negative“ und FP bedeutet „false positive“. Auch hier kann man in der Tabelle 12 und Tabelle 13 ablesen, dass die gewünschte Qualitätsanforderung in der Gesamtberechnung und in den einzelnen Läufen erreicht werden konnte (38).

### 3.3.2.1.3. Richtigkeit

Die Richtigkeit ist definiert als die Gesamtheit der richtigen Varianten, richtig positive sowie richtig negative. Berechnet wird sie laut der Fa. Sophia Genetics wie folgt:  $\frac{(TP+TN)}{(TP+FN+FP+TN)} * 100 = \frac{(19+18)}{(19+1+0+18)} * 100 = 97,36\%$ . Das Beispiel ist wie bei den anderen Spezifikationen von Lauf zwei. Die Ergebnisse laut Tabelle 12 und Tabelle 13 erreichen jeweils über 95% und entsprechen den Anforderungen (38).

### 3.3.2.1.4. Präzision

Als Präzision wird eine Kombination aus Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit verstanden und wird durch die Ratio von richtig und falsch positiven Ergebnissen

wie folgt berechnet:  $\frac{TP}{(TP+FP)} * 100 = \frac{19}{(19+0)} * 100 = 100\%$ . Die eingefügten Zahlen sind wieder von Lauf zwei als Beispiel gedacht (38). Die Abbildung 6 soll den Unterschied zwischen Richtigkeit und Präzision und derer beiden Wichtigkeit verdeutlichen (42). Ein ideales Ergebnis wäre das erste Bild von links. Im Validierungsprozess ist die Präzision (Tabelle 13) mit 72,64% nicht optimal.

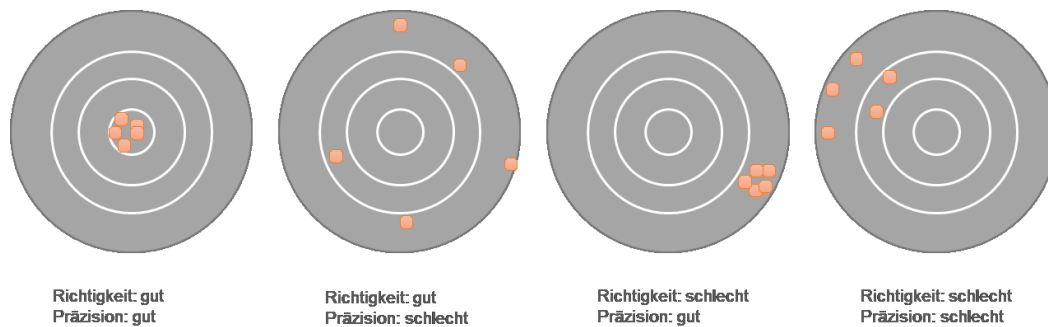


Abbildung 6: Gegenüberstellung Richtigkeit und Präzision (42)

Die Tabelle 13 fasst noch einmal die Ergebnisse von analytischer Sensitivität, analytischer Spezifität, Richtigkeit und Präzision des gesamten Validierungsprozesses zusammen. Diese Werte entstehen durch die Gesamtzahl der Proben.

Institute Test Platform	Kaiser Franz Joseph Spital - KFJ Custom_Oncomine_focus_assay Ion S5
Sensitivity	96.25% [85.47% ]
Specificity	99.88% [99.83% ]
Accuracy	99.87% [99.83% ]
Precision	72.64% [41.74% ]

Tabelle 13: Ergebnisse der festgelegten Kennzahlen (38)

### 3.3.2.1.5. Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit setzt sich aus Sequenzier-Wiederholbarkeit und Varianten-Wiederholbarkeit zusammen. Die Wiederholbarkeit wird generell als ein Duplikat definiert, welches aus der gleichen Probe besteht und unter gleichen Konditionen, wie gleiche Bibliotheksherstellung, Bearbeitung am gleichen Sequenzierer zur gleichen Zeit, durchgeführt wird. Bei der Sequenzier-Wiederholbarkeit werden alle

Probenpaare A und B im gleichen Lauf auf die Übereinstimmung aller „well defined“ (SP) Basen überprüft. Unter SP werden alle Basen mit guter Abdeckung verstanden, also im Programm Sophia DDM nicht als low coverage eingestuft wurden. Die Formel zur Berechnung lautet:  $\frac{\sum i \in [SPA \cap SPB]}{\sum i \in [SPA \cup SPB]}$ . Das Ergebnis der Sequenzier-Wiederholbarkeit, welches beinahe bei 100% liegt, ist in Tabelle 14 abzulesen (38).

Replicate	Run	Samples	Consistent bases	Inconsistent bases			Sequencing Repeatability
				Rep1	Rep2	Both	
replicate1	Run_1	003 004	28049	2	1	3	99.97 %
replicate2	Run_2	004 005	28045	3	6	1	99.96 %

Tabelle 14: Ergebnis Sequenzier-Wiederholbarkeit (38)

Zum Unterschied wird bei der Varianten-Wiederholbarkeit nicht auf alle Basen geachtet, sondern auf die Übereinstimmung der einzelnen Varianten. Die Berechnung lautet wie folgt:  $\frac{\sum i \in [SPA \cap SPB] \delta SPA[i] - SPB[i]}{\sum i \in [SPA \cap SPB]}$  und das Ergebnis von 100% wird in Tabelle 15 dargestellt (38).

Replicate	Run	Samples	Consistent bases	Inconsistent Variants	Variant Repeatability
replicate1	Run_1	003 004	28049	0	100 %
replicate2	Run_2	004 005	28045	0	100 %

Tabelle 15: Ergebnis Varianten-Wiederholbarkeit

Die endgültige Wiederholbarkeit wird als das Produkt von beiden Arten der Wiederholbarkeit definiert. In der Abbildung 7 werden die einzelnen Proben mittels Punkte auf einem Streudiagramm dargestellt. Die grau strichlierten Linien weisen auf die Voraussetzung hoch qualitativer Proben mit einer Lesetiefe >1000 reads hin. Proben im türkisenen Rechteck links unten stellt den Grenzwert für niedrige Varianten-Fractionen, wie SNPs oder Indels von 5% dar. Die Duplikate der Validierungsläufe sind also erfolgreich sequenziert worden (38).

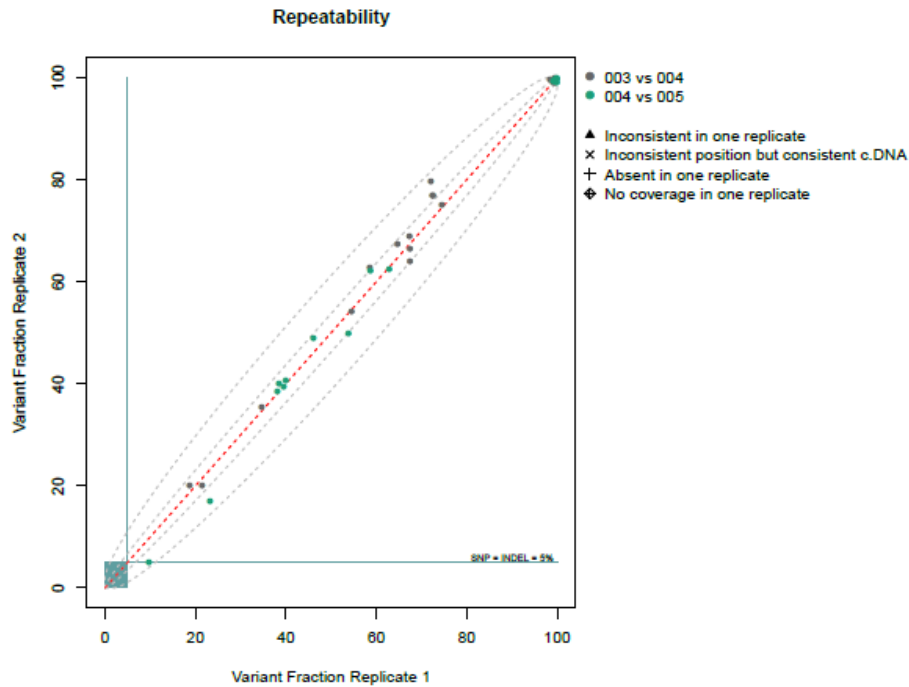


Abbildung 7: Wiederholbarkeit (38)

### 3.3.2.1.6. Reproduzierbarkeit

Das Prinzip der Reproduzierbarkeit entspricht genau der Wiederholbarkeit. Der Unterschied liegt darin, dass es sich nicht um Intra-Lauf Duplikate, sondern um Inter-Lauf Duplikate handelt. Es handelt sich also um Proben, die in einem unabhängigen Sequenzierlauf wiederholt wurden. In folgender Tabelle 16 werden die Ergebnisse zur Sequenzier-Reproduzierbarkeit und in der Tabelle 17 die Ergebnisse zur Varianten-Reproduzierbarkeit dargestellt (38).

Replicate	Run	Samples	Consistent bases	Inconsistent bases			Sequencing Repeatability
				Rep1	Rep2	Both	
replicate3	Run_2	001	28049	0	2	4	99.97 %
	Run_1	007					
replicate4	Run_2	002	28049	0	2	4	99.97 %
	Run_1	002					
replicate5	Run_2	003	28023	25	4	3	99.88 %
	Run_1	005					
	Run_2	007					

Tabelle 16: Ergebnis Sequenzier-Reproduzierbarkeit (38)

Replicate	Run	Samples	Consistent bases	Inconsistent Variants	Variant Repeatability
replicate3	Run_2	001	28049	0	100 %
	Run_1	007			
replicate4	Run_2	002	28049	1	99.99 %
	Run_1	002			
replicate5	Run_2	003	28023	1	99.99 %
	Run_1	005			
replicate6	Run_2	007	28043	2	99.99 %
	Run_3	007-D			

Tabelle 17: Ergebnis Varianten-Reproduzierbarkeit (38)

Wie auch bei der Wiederholbarkeit, wurde zusammenfassend ein Streudiagramm für die Gesamtheit der Reproduzierbarkeit angefertigt. Die Auswertung bleibt im Prinzip wie bei der Wiederholbarkeit. Bis auf ein paar Ausreißer, liegen die meisten Proben innerhalb der gesetzten Fraktion. Ein paar Proben mit schlechter Coverage wurden ausgeschlossen und nicht bei der Berechnung inkludiert (38).

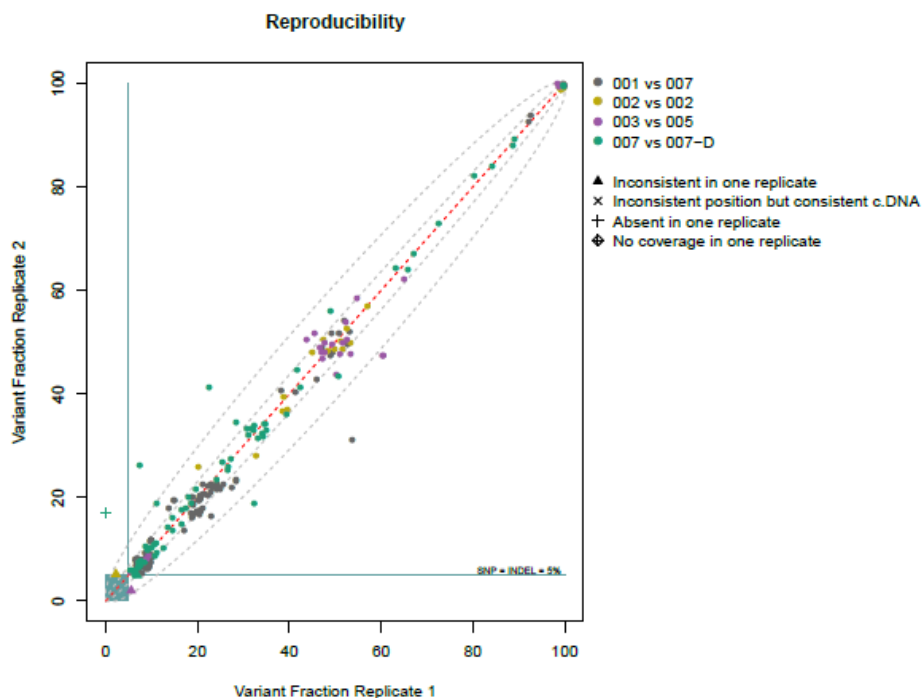


Abbildung 8: Reproduzierbarkeit (38)

In folgender Tabelle 18 werden die Gesamtergebnisse von Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit zusammengefasst. Die Ergebnisse entsprechen einer ausreichenden Qualität.

Institute Test Platform	Kaiser Franz Joseph Spital - KFJ Custom_Oncomine_focus_assay Ion S5
Repeatability	99.97% [99.96% ]
Reproducibility	99.94% [99.87% ]

Tabelle 18: Ergebnisse der Kennzahlen Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit (38)

### 3.3.2.1.7. Limit of detection

Da somatische Mutationen bis 10% Tumorgehalt nachgewiesen werden sollen, muss eine Allelfrequenz von 5% garantiert werden. Im KFJ-Spital wurden dazu elf Routineproben mit Mutationen bei 10% Tumorgehalt mit der Referenzprobe und am Ion S5™ verglichen. Alle Mutationen konnten nachgewiesen werden.

### 3.3.3. IonReporter™ Software

Um eine höhere Repräsentativität garantieren zu können, sollte eine höhere Probenanzahl verwendet werden, als im Validierungsprozess der Fa. Sophia Genetics inkludiert ist. Die Studie von Jennings et al legt eine Mindestanzahl von 59 Proben für somatische Mutationen fest, darum wurden 105 Proben, einschließlich der Proben der sampling-Strategie der Fa. Sophia Genetics, analysiert, mit einer unabhängigen Referenzmethode verglichen und mit der IonReporter™ Software ausgewertet. Zum Unterschied wurden hier auch Wildtyp (WT) Proben getestet, um falsch positive Ergebnisse ausschließen zu können (29).

#### Colon/Leber

Probe	Referenzmethode	Oncomine Focus Assay
1	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Glu)
2	<i>KRAS</i> (Exon 2, Codon 13)	<i>KRAS</i> (p.Gly13Cys)
3	WT	WT
4	WT	WT
5	<i>KRAS</i> (Exon 3, Codon 61)	<i>KRAS</i> (p.Gln61His)
6	WT	WT
7	WT	WT
8	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Glu)
9	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Glu)
10	<i>NRAS</i> (Exon 2, Codon 12)	<i>NRAS</i> (Gly12Asp)
11	WT	WT

12	WT	WT
13	WT	WT
14	WT	WT
15	WT	WT
16	WT	WT
17	<i>KRAS</i> (Exon 2, Codon 12)	<i>KRAS</i> (p.Gly12Val)
18	<i>KRAS</i> (Exon 2, Codon 13)	<i>KRAS</i> (p.Gly13Asp)
19	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Glu)
20	<i>KRAS</i> (Exon 2, Codon 13)	<i>KRAS</i> (p.Gly13Asp)
21	WT	WT
22	<i>KRAS</i> (Exon 2, Codon 12/13)	<i>KRAS</i> (p.Gly12Ala)
23	WT	WT
24	<i>KRAS</i> (Exon 2, Codon 12/13)	<i>KRAS</i> (p.Gly13Asp)
25	<i>KRAS</i> (Exon 2, Codon 12/13)	<i>KRAS</i> (p.Gly12Cys)
26	<i>KRAS</i> (Exon 2, Codon 12/13)	<i>KRAS</i> (p.Gly12Cys)
27	<i>KRAS</i> (Exon 3, Codon 61)	<i>KRAS</i> (p.Gln61His)
28	WT	WT
29	<i>KRAS</i> (Exon 2, Codon 12/13)	<i>KRAS</i> (p.Gly12Ser)
30	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Glu)
31	WT	WT
32	WT	WT
33	<i>NRAS</i> (Exon 3, Codon 61)	<i>NRAS</i> (p.Gln61Leu)
34	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Glu)
35	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Glu)
36	WT	WT
37	<i>KRAS</i> (Exon 2, Codon 12/13)	<i>KRAS</i> (p.Gly12Val)
38	<i>KRAS</i> (Exon 2, Codon 12/13)	<i>KRAS</i> (p.Gly12Ser)
39	WT	WT
40	<i>KRAS</i> (Exon 2, Codon 12/13)	<i>KRAS</i> (p.Gly12Asp)
41	WT	WT
42	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Glu)
43	<i>NRAS</i> (Exon 2, Codon 12)	<i>NRAS</i> (low quality)
44	<i>NRAS</i> (Exon 3, Codon 61)	<i>NRAS</i> (p.Gln61Arg)
45	<i>KRAS</i> (Exon 4, Codon 117)	<i>KRAS</i> (p.Lys117Asn)
46	<i>KRAS</i> (Exon 2, Codon 12)	<i>KRAS</i> (p.Gly12Val)
47	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Glu)

Tabelle 19: Ergebnis tumorrelevanter Mutationen in Colon-/Leberkarzinomen

## Melanom

Probe	Referenzmethode	Oncomine Focus Assay
48	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Glu)
49	<i>BRAF</i> (V600K)	<i>BRAF</i> (p.Val600Lys)
50	WT	WT
51	<i>NRAS</i> (Exon 3, Codon 61)	<i>NRAS</i> (p.Gln61Leu)
52	<i>NRAS</i> (Exon 3, Codon 61)	<i>NRAS</i> (p.Gln61Leu)
53	<i>NRAS</i> (Exon 3, Codon 61)	<i>NRAS</i> (low quality)
54	WT	WT
55	WT	WT

56	<i>BRAF</i> (V600K)	<i>BRAF</i> (p.Val600Lys)
57	<i>BRAF</i> (V600K)	<i>BRAF</i> (p.Val600Lys)
58	<i>BRAF</i> (V600K)	<i>BRAF</i> (p.Val600Lys)
59	WT	WT
60	<i>NRAS</i> (Exon 3, Codon 61)	<i>NRAS</i> (p.Gln61Lys)
61	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (low quality)
62	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Glu)
63	<i>NRAS</i> (Exon 2, Codon 12)	<i>NRAS</i> (p.Gly12Cys, p.?)
64	<i>NRAS</i> (Exon 3, Codon 61)	<i>NRAS</i> (p.Gln61Arg)
65	<i>NRAS</i> (Exon 3, Codon 61)	<i>NRAS</i> (p.Gln61Arg)
66	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Glu)
67	WT	WT
68	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Glu)

Tabelle 20: Ergebnis tumorrelevanter Mutationen in Melanomen

## Lunge

Probe	Referenzmethode	Oncomine Focus Assay
69	<i>EGFR</i> (G719X)	<i>EGFR</i> (p.Gly719Ala)
70	<i>KRAS</i> (Exon 2, Codon 12)	<i>KRAS</i> (p.Gly12Cys, p.Gly12Phe)
71	<i>KRAS</i> (Exon 2, Codon 12)	<i>KRAS</i> (p.Gly12Cys)
72	<i>EGFR</i> (L858R)	<i>EGFR</i> (p.Leu858Arg)
73	<i>EGFR</i> Deletion	<i>EGFR</i> (p.Glu746_Ala750del)
74	<i>EGFR</i> Deletion	<i>EGFR</i> (p.Glu746_Ala750del)
75	<i>EGFR</i> (Exon 20 Insertion)	<i>EGFR</i> (p.Met766_Ala767insAlaSerVal)
76	<i>EGFR</i> (G719X)	<i>EGFR</i> (p.Gly719Ala, p.Glu709Lys)
77	<i>EGFR</i> (G719X, T790M)	<i>EGFR</i> (p.Gly719Ala, p.Thr790Met, p.Glu709Lys)
78	WT	WT
79	<i>ALK</i> Fusion	EML4(18) – <i>ALK</i> (20)
80	<i>ALK</i> Fusion	EML4(17) – <i>ALK</i> (20)
81	<i>EGFR</i> (L858R, T790M)	<i>EGFR</i> (p.Leu858Arg, p.Thr790Met)
82	<i>EGFR</i> (Exon 19 Deletion)	<i>EGFR</i> (p.Glu746_Ala750del)
83	<i>EGFR</i> (Exon 19 Deletion)	<i>EGFR</i> (p.Glu746_Ser752delinsVal)
84	<i>EGFR</i> (Exon 19 Deletion)	<i>EGFR</i> (p.Glu746_Ala750del)
85	<i>EGFR</i> (G719X, T790M)	<i>EGFR</i> (p. Gly719Ala, p.Thr790Met, p.Glu709Lys)

Tabelle 21: Ergebnis tumorrelevanter Mutationen in Lungenkarzinomen

## Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)

Probe	Referenzmethode	Oncomine Focus Assay
86	<i>KIT</i> (Exon 11 GTT>GAT)	<i>KIT</i> (p.Val559Asp)
87	<i>KIT</i> (Exon 13 AAA>GAA, GTG>GCG)	<i>KIT</i> (p.Lys642Glu, p.Val654Ala)
88	<i>KIT</i> (Exon 11 GTT>GGT)	<i>KIT</i> (p.Val559Gly)
89	<i>KIT</i> (Exon 11 ATGTAG Deletion)	<i>KIT</i> (p.Met552_Tyr553del)
90	<i>KIT</i> (Exon 11 GTT>GAT)	<i>KIT</i> (p.Val559Asp)

Tabelle 22: Ergebnis tumorrelevanter Mutationen in gastrointestinalen Stromatumoren

## Sonstiges

Probe	Referenzmethode	Oncomine Focus Assay
91	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Glu)
92	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Glu)
93	WT	WT
94	<i>KRAS</i> (Exon 2, Codon 12)	<i>KRAS</i> (p.Gly12Asp)
95	FGFR3 (R248C)	FGFR3 (p.Arg248Cys)
96	FGFR3 (R248C)	FGFR3 (p.Arg248Cys)
97	WT	WT
98	WT	WT
99	WT	WT
100	WT	WT
101	WT	WT
102	WT	WT
103	<i>NRAS</i> (Exon 3, Codon 61)	<i>NRAS</i> (p.Gln61Lys)
104	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Glu)
105	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>BRAF</i> (p.Val600Gly, p.Val600_Lys601delinsGlu)

Tabelle 23: Ergebnis tumorrelevanter Mutationen sonstiger Karzinome

Die Testergebnisse der Tabellen 19 bis 23 stimmen zu 100% überein. In vier Fällen, welche in den Tabellen gelb markiert sind, wurden zusätzliche Varianten detektiert, zu denen ein Eintrag in der ClinVar-Datenbank vorhanden ist und daher für die Kliniker evtl. von großer Bedeutung in Hinsicht auf die Therapiegabe sein können. Probe Nr. 76, 77 sowie 85 enthalten die zusätzliche Mutation NM\_005228.5(EGFR):c.2125G>A (p.Glu709Lys) und Probe Nr. 105 die Mutation NM\_004333.6(BRAF):c.1799\_1801del (p.Val600\_Lys601delinsGlu) welche in der Referenzmethode nur als V600E im *BRAF*-Gen erkannt werden konnte.

Drei Resultate, welche in den Tabellen rot markiert sind, wurden mit der Bemerkung „low quality“ markiert, aber falsch negative oder positive Ergebnisse gibt es nicht. Hier könnte man die Proben noch einmal mit einer neuen Bibliothek wiederholen, um ein eindeutiges Ergebnis zu erzielen. Außerdem muss der IGV zur Visualisierung und Kontrolle herangezogen werden. In folgender Abbildung 9 ist eine heterozygote Mutation NM\_004985.5(*KRAS*):c.34G>C (p.Gly12Arg) bei 30% Tumorprozent im *KRAS*-Gen zu erkennen. Die Allelfrequenz für die Variante G beträgt 14%.

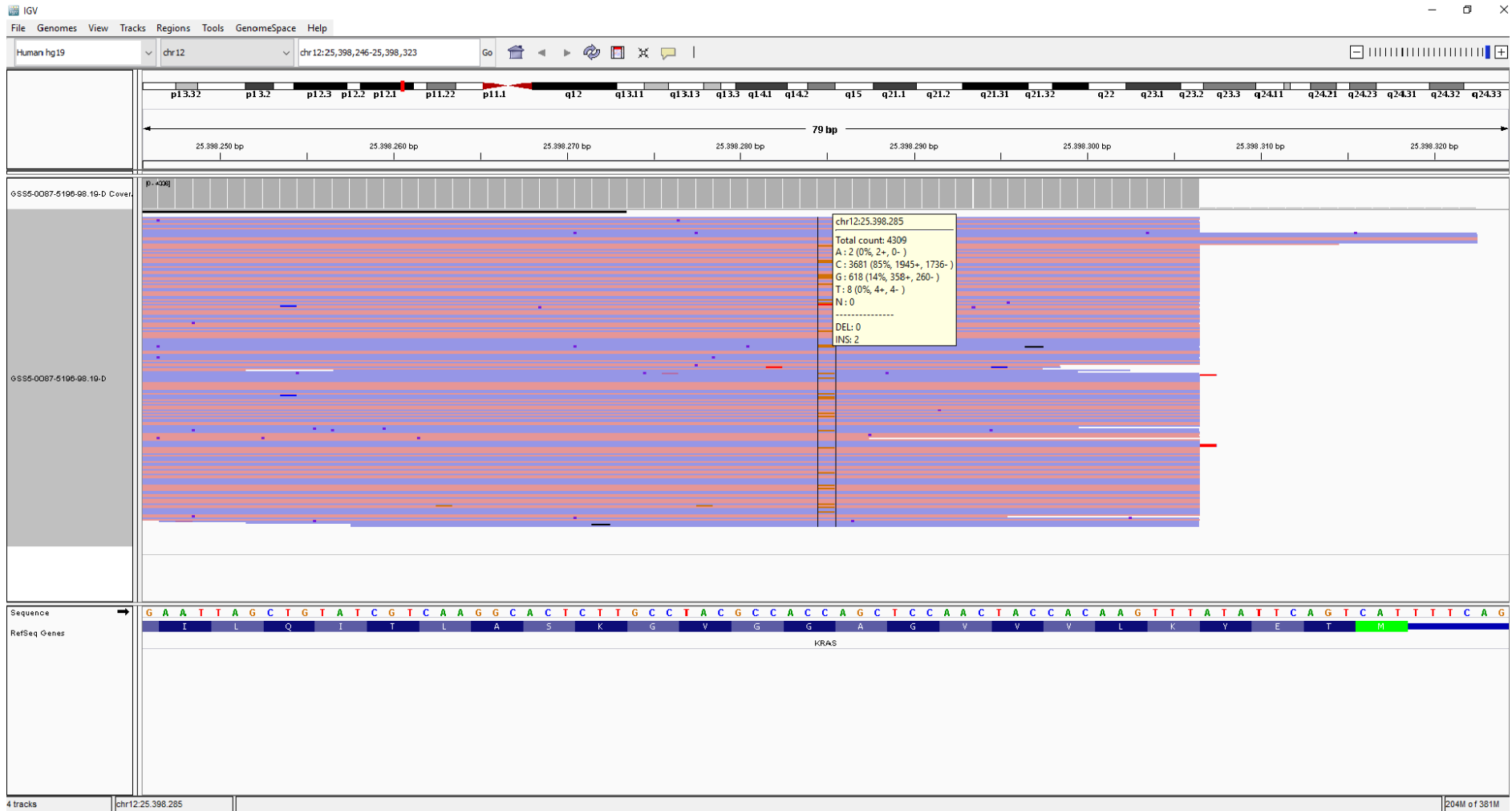


Abbildung 9: Heterozygote KRAS Mutation (p.Gly12Arg) visualisiert im Integrative Genome Viewer

### 3.3.4. Festgelegte tumorrelevante Gene

Laut aktueller WHO Klassifikationen wurden tumorrelevante Gene für bestimmte Tumorentitäten festgelegt (43–47). In Tabelle 24 sind Mutationen, Amplifikationen und Fusionen dargestellt, die in jedem Fall im molekularpathologischen Befund des KFJ-Spitals angegeben werden müssen. Weiters wurde im KFJ-Spital beschlossen, auch Mutationen anzugeben, für welche ein ClinVar-Eintrag mit dem Hinweis auf pathogene oder wahrscheinlich pathogene Veränderungen existiert.

<b>Adenokarzinom des Dickdarms (43)</b>	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i> <i>NRAS</i>
<b>Adenokarzinom des Pankreas (43)</b>	<i>ERBB2</i> (CNV) <i>KRAS</i>
<b>Adenokarzinom des Magens (43)</b>	<i>CTNNB1</i> <i>ERBB2</i> (CNV) <i>FGFR2</i> (CNV) <i>KRAS</i> <i>MET</i> (CNV) <i>MYC</i> (CNV)
<b>Malignes Melanom der Haut (44)</b>	<i>BRAF</i> <i>NRAS</i> <i>KIT</i> Seltener: <i>IDH1</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>AKT1/3</i> , <i>GNAQ</i> , <i>GNA11</i>
<b>Harnblasenkarzinom (46)</b>	<i>ERBB2</i> (CNV) <i>FGFR3</i> (SNV, Fusion) <i>PIK3CA</i> <i>EGFR</i>
<b>Azinäres Adenokarzinom der Prostata (46)</b>	<i>PIK3CA</i> (SNV, CNV) <i>AKT1</i> (SNV, CNV) <i>MYC</i> (CNV)
<b>Keimzelltumore des Hodens (46)</b>	<i>KIT</i> (SNV, CNV) <i>KRAS</i>
<b>Leber – Hepatozelluläres Adenom und Karzinom (43)</b>	<i>CTNNB1</i>
<b>Cholangiozelluläres Karzinom (43)</b>	<i>EGFR</i> <i>ERBB2</i> (CNV)
<b>Gastrointestinaler Stromatumor (43)</b>	<i>PDGFRA</i> <i>KIT</i> Seltener: <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> , <i>AKT1</i> , <i>MTOR</i> , <i>ERG</i> , <i>CDK6</i> und <i>NTRK2</i> Fusionen
<b>Adenokarzinom der Lunge (47)</b>	<i>ALK</i> (Fusion) <i>ROS1</i> (Fusion)

	<i>EGFR</i> <i>KRAS</i> Seltener: <i>PIK3CA</i> , <i>ERBB2</i> , <i>BRAF</i> , <i>NRAS</i> , <i>RET</i> , <i>IDH</i> (keine etablierte Therapie vorhanden)
<b>Plattenepithelkarzinom der Lunge (47)</b>	<i>EGFR</i> <i>PIK3CA</i> <i>FGFR1</i> (CNV) <i>DDR2</i>
<b>Mammakarzinom (45)</b>	<i>ERBB2</i> (CNV) <i>PIK3CA</i>

*Tabelle 24: Tumorrelevante Gene laut WHO-Klassifikation (43–47)*

### **3.3.5. Befundung**

Deans et al fasst in einem Review zusammen, welche Information in einem NGS-Befund unbedingt inkludiert sein sollte (8). Das KFJ-Spital hat sich mit diesen Kriterien auseinandergesetzt und einen Befundtext erstellt, der die wichtigsten Punkte beinhalten soll, aber auch für die Kliniker übersichtlich bleiben soll. Im Abgleich mit dem Wilhelminenspital, welches wie das KFJ-Spital auch zum Wiener Krankenanstaltenverbund (KAV) gezählt wird, wurde besprochen, dass eine Vereinheitlichung innerhalb des Verbunds von großem Interesse ist. Mit der nahezu gleichzeitigen Einführung der NGS-Methode mit dem Oncomine™ Focus Assay am Ion S5 von der Fa. IonTorrent soll der erste Schritt getan werden.

Der Befund beinhaltet, wie in Abbildung 10 nur teilweise dargestellt, da Patientendaten ausgeschnitten wurden, folgende Inhalte: Patienteninformationen mit Vor- und Zunamen und Geburtsdatum, fortlaufende molekularpathologische Nummer, Material der Probe (FFPE-Gewebe), Gewebetyp bzw. Tumortyp, Paraffinblocknummer und evtl. Hinweis auf externes Krankenhaus/Privatklinik, Tumorprozent, Umfang des verwendeten Assays und Methode, Sequenzierplattform, Sensitivität der Methode (Tumorprozent >10%), Referenzgenom, tumorrelevante Gene, normgerechte Angabe des Ergebnisses, Methode zur DNA/RNA Gewinnung, technische Aspekte als Hinweis zur Qualität der Probe und technischer und medizinischer Befunder.

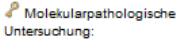

E-Nummer:	<a href="#">5309-5311/2019</a> <a href="#">Etiketten nachdrucken</a>
Gewinnung:	<b>Paraffinblock</b>
Material:	<b>Sonstiges</b>
Zusätzliche Angaben zum Material:	Oncomine DNA
 Molekularpathologische Untersuchung:	<p>Pet/Pri</p> <p>Untersuchung: Nachweis von somatischen Mutationen der 52 relevanten Gene von soliden Tumoren mittels Next Generation Sequencing (Sequencing Plattform – Ion GeneStudio S5, Oncomine Focus DNA Assay, Fa. ThermoFisher SCIENTIFIC). Bioinformatik: SOPHIA DDM® analytical platform, Ion Reporter™ Software</p> <p>Ausgangsmaterial: Paraffinblock (RUS 17647/19 D I 5 Pol) Tumoranteil ca. 80% der Zellzahl des untersuchten Materials.</p> <p>DNA Isolation aus FFPE Gewebe: MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I</p> <p>100% der Amplikons sind mit mindestens 500 Reads abgedeckt. Es wurden alle Hotspot Regionen erfolgreich sequenziert. Vergleich mit Referenzgenom Hg19.</p> <p>Ergebnis der tumorrelevanten Gene: KRAS: Wildtyp BRAF: Wildtyp NRAS: Wildtyp</p>
 Molekularpathologischer Befund:	<p><b>Im vorliegenden Untersuchungsmaterial Mutationen im KRAS-, BRAF- und NRAS-Gen NICHT nachweisbar.</b></p> <p><b>Variante von pathogener oder wahrscheinlich pathogener Signifikanz: NM_001982.3(ERBB3):c.310G&gt;A (p.Val104Met)</b></p> <p><b>(Weitere) Varianten von fehlender oder unklarer Signifikanz nachweisbar, Mitteilung auf Anfrage.</b></p>
 Anmerkungen:	<p>Untersuchte Gene:</p> <p>Hotspot Genes – AKT1, ALK, AR, BRAF, CDK4, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, FGFR2, FGFR3, GNA11, GNAQ, HRAS, IDH1, IDH2, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, MTOR, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RAF1, RET, ROS1, SMO</p> <p>Copy Number Variants – AKT1, ALK, AR, BRAF, CCND1, CDK4, CDK6, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, KIT, KRAS, MET, MYC, MYCN, PDGFRA, PIK3CA</p> <p>Limitationen:</p>

Abbildung 10: Befundbeispiel

### **3.3.6. Erweiterung der Validierung auf 530er Chip**

Die Validierung musste erweitert werden, da das Probenaufkommen des KFJ-Spitals in Zukunft die Kapazität der 510er und 520er Chips überschreiten wird. Darum wurde zusätzlich ohne Mitwirken des externen Partners der 530er Chip teilvalidiert. Unter Teilvalidierung versteht man die Validierung eines einzelnen veränderten Schrittes des gesamten Prozesses. Da jegliche weiteren Teilschritte unverändert blieben, ist das ausreichend. In diesem Fall ist nur der Sequenzierschritt am Ion S5™ System betroffen. Ausgewählte Proben wurden auf den 520er Chip und dieselbe Library zusätzlich auf den 530er Chip beladen. Die Ergebnisse waren ident.

### **3.3.7. Kostenaufstellung**

Der Wiener KAV, wessen das KFJ-Spital wie schon erwähnt zugehörig ist, verfügt über einen Ambulanzselbstzahlerkatalog (ASZK). Jegliche medizinischen Leistungen aller Abteilungen werden auf deren Kosten kalkuliert und erhalten eine spezifische ASZK-Nummer. Die Kosten für die verwendete Referenzmethode für *KRAS*, *BRAF/NRAS* und *EGFR* mittels Real-Time-PCR am Cobas z480 Analyzer der Fa. Roche wurden mit 320,53€ festgelegt, welches zum Beispiel dem kompletten Betrag für eine *EGFR*-Mutationsanalyse entspricht, solange dieses mutiert ist. Ist das Gen jedoch ein Wildtyp, müssen *ALK* und *ROS1* zusätzlich mittels FISH-Sonden analysiert werden, welche ebenso je 320,53€ kosten. Die Gesamtkosten liegen hier also bei 961,59€. Der Preis für einen sogenannten *RAS*-Status (bei *KRAS* Wildtyp), welcher aus der Ermittlung von Mutationen in den Genen *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* besteht, beträgt somit 641,06€. Die Sanger-Sequenzierung wurde mit 434,67€ ermittelt, welche für den *KIT* und *PDGFRA* Mutationsstatus benötigt wird. Der Oncomine™ Focus Assay am Ion 520 Chip wurde mit 709,25€ kalkuliert und ist somit die teuerste Methode. Allerdings muss man beachten, dass mehr mögliche tumorrelevante Gene parallel zusätzlich sequenziert werden, die möglichen Stufendiagnosen nicht einberechnet werden müssen und diverse Gene nicht einzeln sequenziert werden müssen. Die Arbeitszeit muss natürlich auch miteingeplant werden, welche bei einer NGS-Analyse bei ca. 2,5 Arbeitstage liegt. Dies ist weitaus länger als die ca. zwei Stunden der fertigen Real-Time-PCR-Kits von Roche. DNA- bzw. RNA-Isolierung

aus FFPE-Material wurden beim Vergleich nicht miteinberechnet, da sie für beide Methoden ident sind.

## 4. Diskussion

Im Zuge der gewünschten Einführung des NGS-Systems im molekularpathologischen Bereich des KFJ-Spitals wurde schnell klar, dass eine Zusammenarbeit mit einem externen Partner von großer Hilfe sein würde. Es war keinerlei praktische Erfahrung im technischen Team sowie im medizinischen Team mit der neuen Technologie vorhanden. Zusätzlich war der Druck groß, das System rasch und vollständig zu validieren, da aufgrund der neuen IVD-R die Erreichung der ÖNORM EN ISO 15189:2012 bis zum Jahr 2022 angestrebt wird und diese die Validierung eines Produkts ohne CE-Markierung vorgibt.

Zu Beginn war der Ablauf der ersten Sequenzierläufe von der Fa. Sophia Genetics zunächst klar definiert worden. Leider hat sich herausgestellt, dass die Dauer zwischen den einzelnen Validierungsläufen teilweise sehr lang war, was auf lange Bearbeitungszeiten der einzelnen hochgeladenen Läufe auf Seite der externen Firma aber auch auf plötzliche Personaleinschränkungen im KFJ-Spital zurückzuführen war. Bei der Einführung eines weiteren Assays kann dies aus dieser Erfahrung heraus von Beginn an berücksichtigt werden und sollte keine weiteren Probleme darstellen.

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass die Validierung mit der Firma Sophia Genetics nur unterstützend und für das diagnostische Setting nicht abgeschlossen ist, da die Probenzahl nach vier Läufen zu gering ist (29, 48). Die geringe Probenanzahl nach diesen ersten Läufen ist zusätzlich auf einen Fehler bei der Probenauswahl zurückzuführen, da nicht bedacht wurde, dass liquid biopsy Ringversuchsproben mit bekannten und bestätigten Varianten nicht für den verwendeten Assay geeignet sind, da nur FFPE Gewebe zugelassen ist. Eine RNA Probe musste auch ausgeschlossen werden, da die Translokation t(9;22) nicht detektiert werden kann, was fälschlicherweise angenommen wurde. Es konnten so noch weniger Proben zur Berechnung der Endergebnisse herangezogen werden, was bei der ohnehin geringen Probenanzahl große Auswirkungen hat. Die Möglichkeit zum Austausch eines Laufes gab es nicht. Die

Spezifikation „Limit of detection“ musste ebenso selbst berechnet werden und auch zusätzliche Chipgrößen der Fa. ThermoFisher Scientific müssen separat mitgeführt werden, um sie bei der Validierung des Panels und damit in der Routinediagnostik einsetzen zu können. Die Flexibilität eines eigens entwickelten Validierungsprozesses wie am Beispiel der Pathologie oder der Genetik der Medizinischen Universität in Graz zu sehen ist, kann mit einer externen Firma nicht erreicht werden. Kritisch anzusehen ist auch die mangelnde Rückführbarkeit der einzelnen Ergebnisse in den Läufen. Die einzelnen Proben werden bei den erstellten Statistiken teilweise in anderer Reihenfolge wiedergegeben, sodass der Einblick im Nachhinein zeitaufwendiger und komplizierter war als notwendig.

Da in unserem Institut allerdings kein/e Bioinformatiker/in oder Qualitätsmanager/in angestellt ist, hätte die Etablierung des NGS-Systems die Personkapazität weit übertroffen, weshalb man sich entschieden hat Wissen zuzukaufen. Die Pipeline von der Fa. Sophia Genetics in der Software SOPHiA DDM. ist flexibel anwendbar und weist einige Funktionen auf, die in Zukunft bei einer eventuellen Zusammenarbeit mit den Klinikern am KFJ-Spital hilfreich sein können. Diese sind zum Beispiel das Anzeigen von aktuellen klinischen Studien oder entwickelten Therapien. Zurzeit kann die Pipeline noch nicht zur Gänze genutzt werden und dient als externe Methode. Alle Proben wurden in der Pipeline in der IonReporter™ Software ausgewertet, welche für diagnostische Zwecke ausreichend ist und die validierte Methode darstellt. Für Forschungs- und Entwicklungszwecke ist die SOPHiA DDM Software aber empfehlenswert.

In Zukunft wird das KFJ-Spital zur Validierung von weiteren Assays wieder auf externe Partner zurückgreifen, da die Vorteile im Gesamten überwiegen und aus Fehlern bzw. Missverständnisse gelernt werden konnte.

Generell wurde der Umstieg von Real-Time PCR auf NGS zu Beginn sehr kritisch bewertet. Zum einen war die Anschaffung des Systems sehr teuer, ebenso wie die Bestandhaltung aufgrund der hohen Reagenzienkosten und zum anderen bestand ein zusätzlicher Zeitaufwand mit mehr Personalbedarf. Das KFJ-Spital startet das System seit der Einführung in die Routine einmal pro Woche mit zwei 520er Chips mit insgesamt 16 Proben. Dies führt zu längeren Wartezeiten seitens der Kliniker, da die Ergebnisse jetzt innerhalb von zehn Tagen fertig befundet sind, je nachdem

wann die Probe einlangt. Davor waren es höchstens sieben Tage und die Analyse mittels Real-Time-PCR konnte in akuten Fällen jederzeit gestartet werden. Innerhalb des Instituts wurde nun festgelegt, dass in Ausnahmefällen die schnellere Variante verwendet werden darf, um in dringenden Fällen lange Wartezeiten vermeiden zu können. Abgesehen davon haben die Kliniker mit großem Interesse an der neuen Technologie reagiert und die Nachfrage war von Beginn an sehr hoch. Die zusätzlichen Informationen wie Therapievorschläge und tumorrelevante Mutationen in bis jetzt nicht analysierte Gene bringen einen klaren Vorteil mit sich und die anfängliche Skepsis konnte überwunden werden.

## **5. Konklusion**

Aufgrund der oben angeführten Erneuerung der IVD-R ist die Erreichung der EN ISO 15189:2012 (D) für das KFJ-Spital und sämtliche Pathologien in Österreich unausweichlich und damit auch die Validierung des einzuführenden Oncomine™ Focus Assay auf der Plattform Ion Torrent™ Ion S5 der Fa. ThermoFisher Scientific. Die Herausforderung für Gesundheitseinrichtungen ohne vertiefende Kenntnisse im Qualitätsmanagement ist enorm und darum ist es von Vorteil mit einem externen Partner, wie hier kommerziell mit Sophia Genetics oder ein anderes externes Institut, welches selbst schon Validierungen von NGS Kits im diagnostischen Setting durchgeführt hat, zusammenzuarbeiten.

Alle notwendigen Leistungsspezifikationen wurden erreicht, in der Arbeit dokumentiert und damit die Validierung des Assays erfolgreich abgeschlossen.

## Literatur

1. In-vitro-Diagnostika-Verordnung: IVDR; 2017.
2. Lih C-J, Harrington RD, Sims DJ, Harper KN, Bouk CH, Datta V et al. Analytical Validation of the Next-Generation Sequencing Assay for a Nationwide Signal-Finding Clinical Trial: Molecular Analysis for Therapy Choice Clinical Trial. *J Mol Diagn* 2017; 19(2):313–27. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.10.007.
3. StudyLib. Kleines QM - Lexikon. Verfügbar unter: <https://studylibde.com/doc/2066557/kleines-qm>.
4. VOREST AG. Qualitätsmanagement ISO 9001: Die Qualitätsmanagement ISO 9001 Definition. Verfügbar unter: [https://www.qualitaetsmanagement.me/qualitaetsmanagement\\_iso\\_9001/definition/](https://www.qualitaetsmanagement.me/qualitaetsmanagement_iso_9001/definition/).
5. International Organisation of Standardization. ISO 9001:2015 Qualitätsmanagementsysteme - Anforderungen; 2015 2015.
6. Kinns H, Pitkin S, Housley D, Freedman DB. Internal quality control: best practice. *J Clin Pathol* 2013; 66(12):1027–32. doi: 10.1136/jclinpath-2013-201661.
7. International Organisation of Standardization. ISO 15189:2012 Medizinische Laboratorien - Anforderungen an die Qualität und Kompetenz; 2012 2012.
8. Deans ZC, Costa JL, Cree I, Dequeker E, Edsjö A, Henderson S et al. Integration of next-generation sequencing in clinical diagnostic molecular pathology laboratories for analysis of solid tumours; an expert opinion on behalf of IQN Path ASBL. *Virchows Arch* 2017; 470(1):5–20. doi: 10.1007/s00428-016-2025-7.
9. McCourt CM, McArt DG, Mills K, Catherwood MA, Maxwell P, Waugh DJ et al. Validation of next generation sequencing technologies in comparison to current diagnostic gold standards for BRAF, EGFR and KRAS mutational analysis. *PLoS ONE* 2013; 8(7):e69604. doi: 10.1371/journal.pone.0069604.
10. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017; 19(1):4–23. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.10.002.
11. Deutsche Akkreditierungsstelle (DAkkS). 71 SD 4 037 Leitfaden des Sektorkomitees Pathologie/Neuropathologie für die Validierung von Untersuchungsverfahren in der Molekularpathologie; 2015 2015.
12. G. Höfler, K. Zatloukal, F. Fend. ÖGP Qualitätsstandards in der Pathologie: Molekularpathologie 2.2: Österreichische Gesellschaft für Pathologie; 2000. Verfügbar unter:

<https://www.pathology.at/images/stories/PDF/Qualitaetsstandards/qsmolekularpathologie.pdf>.

13. Anagnostou VK, Welsh AW, Giltnane JM, Siddiqui S, Liceaga C, Gustavson M et al. Analytic variability in immunohistochemistry biomarker studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19(4):982–91. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0097.
14. Kap M, Lam KH, Ewing-Graham P, Riegman P. A reference image-based method for optimization of clinical immunohistochemistry. *Histopathology* 2015; 67(2):193–205. doi: 10.1111/his.12646.
15. H.P. Dinges, H. Denk, A. Reiner, F.G. Würtz. ÖGP Qualitätsstandards in der Pathologie: Immunhistochemie 2.1: Österreichische Gesellschaft für Pathologie; 2002. Verfügbar unter: <https://www.pathology.at/images/stories/PDF/Qualitaetsstandards/qsimmunhistochemie.pdf>.
16. Mascarenhas L, Shanley S, Mitchell G, Spurdle AB, Macrae F, Pachter N et al. Current mismatch repair deficiency tumor testing practices and capabilities: A survey of Australian pathology providers. *Asia Pac J Clin Oncol* 2018; 14(6):417–25. doi: 10.1111/ajco.13076.
17. Yokoyama T, Takehara K, Sugimoto N, Kaneko K, Fujimoto E, Okazawa-Sakai M et al. Lynch syndrome-associated endometrial carcinoma with MLH1 germline mutation and MLH1 promoter hypermethylation: a case report and literature review. *BMC Cancer* 2018; 18(1):576. doi: 10.1186/s12885-018-4489-0.
18. van der Klift H, Wijnen J, Wagner A, Verkuilen P, Tops C, Otway R et al. Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(2):123–38. doi: 10.1002/gcc.20219.
19. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 1986; 232(4758):1644–6.
20. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999; 17(9):2639–48. doi: 10.1200/JCO.1999.17.9.2639.
21. Xiao Y, Gao X, Maragh S, Telford WG, Tona A. Cell lines as candidate reference materials for quality control of ERBB2 amplification and expression assays in breast cancer. *Clin Chem* 2009; 55(7):1307–15. doi: 10.1373/clinchem.2008.120576.
22. Hayes DF, Picard MH. Heart of darkness: the downside of trastuzumab. *J Clin Oncol* 2006; 24(25):4056–8. doi: 10.1200/JCO.2006.07.5143.

23. Rüschoff J, Hanna W, Bilous M, Hofmann M, Osamura RY, Penault-Llorca F et al. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Mod Pathol* 2012; 25(5):637–50. doi: 10.1038/modpathol.2011.198.
24. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013; 31(31):3997–4013. doi: 10.1200/JCO.2013.50.9984.
25. Ngo C, Laé M, Ratour J, Hamel F, Taris C, Caly M et al. Contrôle de qualité interne de la détermination du statut HER2 dans les cancers du sein : expérience d'un centre de lutte contre le cancer. *Bull Cancer* 2017; 104(7-8):608–17. doi: 10.1016/j.bulcan.2017.05.002.
26. Bijwaard K, Dickey JS, Kelm K, Težak Ž. The first FDA marketing authorizations of next-generation sequencing technology and tests: challenges, solutions and impact for future assays. *Expert Rev Mol Diagn* 2015; 15(1):33–40. doi: 10.1586/14737159.2015.979795.
27. Gargis AS, Kalman L, Berry MW, Bick DP, Dimmock DP, Hambuch T et al. Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. *Nat Biotechnol* 2012; 30(11):1033–6. doi: 10.1038/nbt.2403.
28. Neveling K, Hoischen A. Einführung in die Grundlagen der Hochdurchsatzsequenzierung | Introduction to the basics of next generation sequencing. *medizinische genetik* 2014; 26(2):231–8. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1007/s11825-014-0447-7>.
29. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017; 19(3):341–65. doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.01.011.
30. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 1998; 8(3):186–94.
31. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 1998; 8(3):175–85. doi: 10.1101/gr.8.3.175.
32. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009; 25(16):2078–9. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.
33. Hatem A, Bozdağ D, Toland AE, Çatalyürek ÜV. Benchmarking short sequence mapping tools. *BMC Bioinformatics* 2013; 14:184. doi: 10.1186/1471-2105-14-184.
34. Weißmann R, Gilissen C. NGS Datenanalyse und Qualitätskontrolle | NGS data analysis and quality control. *medizinische genetik* 2014; 26(2):239–45. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1007/s11825-014-0448-6>.

35. Marchetti A, Felicioni L, Buttitta F. Assessing EGFR mutations. *N Engl J Med* 2006; 354(5):526-8; author reply 526-8. doi: 10.1056/NEJMc052564.
36. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 2012; 13:341. doi: 10.1186/1471-2164-13-341.
37. Do H, Dobrovic A. Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil- DNA glycosylase. *Oncotarget* 2012; 3(5):546–58. doi: 10.18632/oncotarget.503.
38. SOPHiA Genetics. Analytical Performance Report: Kaiser Franz Joseph Spital - KFJ [Oncomine Focus on Ion S5]; Februar 26 Februar 26.
39. ThermoFisher Scientific. Performance Training; 2018/2019 2018/2019. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/at/en/home/clinical/preclinical-companion-diagnostic-development/oncomine-oncology/oncomine-focus-assay.html>.
40. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008; 26(10):1135–45. doi: 10.1038/nbt1486.
41. ThermoFisher Scientific. Ion Sequencing Chips and Throughput Flexibility of the Ion GeneStudio S5 Series. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-workflow/ion-torrent-next-generation-sequencing-run-sequence/ion-s5-ngs-targeted-sequencing/throughput-flexibility-ion-s5-next-generation-sequencing-systems.html>.
42. Dalrymple KA, Manner MD, Harmelink KA, Teska EP, Elison JT. An Examination of Recording Accuracy and Precision From Eye Tracking Data From Toddlerhood to Adulthood. *Front. Psychol.* 2018; 9:48. doi: 10.3389/fpsyg.2018.00803.
43. Bosman FT, Hrsg. WHO classification of tumours of the digestive system: Reflects the views of a working group that convened for an editorial and consensus conference at the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, December 10 - 12, 2009 ; third volume of the 4th edition of the WHO series on histological and genetic typing of human tumours. 4. ed., 1. print run. Lyon: IARC; 2010. (World Health Organization classification of tumours3 (der 4. ed.)).
44. Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R, Hrsg. WHO classification of skin tumours. 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2018. (World Health Organization classification of tumours).
45. Lakhani SR, Hrsg. WHO classification of tumours of the breast: Views of a working group that convened for a consensus and editorial meeting at the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, September 1 - 3, 2011. 4. ed. Lyon: Internat. Agency for Research on Cancer; 2012. (World Health Organization classification of tumours4 (der 4. ed.)).

46. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Hrsg. WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs: ... consensus and editorial meeting at the University Hospital Zürich, Zürich, 11-13 March, 2015. Lyon: IARC Press; 2016. (World Health Organization classification of tumours; Bd. 6).
47. Travis WD, Hrsg. WHO classification of tumours of lung, pleura, thymus and heart: ... reflects the views of a working group that convened for a consensus and editorial meeting at the International Agency for Research on Cancer, Lyon, April 24 - 26, 2014. 4. ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2015. (World Health Organization classification of tumours7 (der 4. ed.)).
48. Williams HL, Walsh K, Diamond A, Oniscu A, Deans ZC. Validation of the OncoPrint™ focus panel for next-generation sequencing of clinical tumour samples. *Virchows Arch* 2018; 473(4):489–503. doi: 10.1007/s00428-018-2411-4.

## Anhang

### Primer *KIT*:

Exon 9 Forward: ATgCTCTgCTTCTgTACTgCC  
Exon 9 Reverse: CAgAgCCTAAACATCCCCTTA  
Exon 11 Forward: CCAgAgTgCTCTAATgACTg  
Exon 11 Reverse: ACCCAAAAaggTgACATggA  
Exon 13 Forward: CATCAgTTTgCCAgTTgTgC  
Exon 13 Reverse: ACACggCTTTACCTCCAATg  
Exon 17 Forward: TgTATTCACAgAgACTTggC  
Exon 17 Reverse: ggATTTACATTATgAAAgTCACAgg

### Primer *PDGFRA*:

Exon 12 Forward: AAgCTCTggTgCACTgggACTT  
Exon 12 Reverse: ATTgTAAAgTTgTgTgCAAgggA  
Exon 18 Forward: TACAgATggCTTgATCCTgAgT  
Exon 18 Reverse: AgTgTgggAggATgAgCCTg