

# Ringversuchsbericht defiziente DNA- Mismatch-Repair (dMMR) Split 1 (IHC)

## Inhaltsverzeichnis

1. Kontaktdaten und Unteraufträge.....	3
2. Interner Ringversuch.....	3
2.1 Methodenauswahl der Lead- und Panelinstitute .....	3
2.2 Ergebnisse des internen Ringversuchs.....	4
3. Offener Ringversuch .....	5
3.1 Zusammensetzung und Sollwerte des Probenmaterials .....	5
3.2 Bewertungskriterien.....	6
3.3 Ergebnisse .....	6
3.4 Methodische Angaben der Teilnehmer.....	7
3.5 Ungewöhnliche Vorkommnisse .....	10
4. Schlussfolgerung.....	10

## 1. Kontaktdaten und Unteraufträge

Der Ringversuch defiziente DNA-Mismatch-Repair (dMMR) Split 1 (IHC) 2022 wurde durchgeführt von der:

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

Die wissenschaftliche Leitung des dMMR Split 1 (IHC) Ringversuches übernahmen Prof. Dr. med Hendrik Bläker und Dr. Anne Kathrin Höhn des Universitätsklinikums Leipzig.

Institut für Pathologie  
 Universitätsklinikum Leipzig AöR  
 Liebigstr. 26  
 04103 Leipzig

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

## 2. Interner Ringversuch

Das Universitätsklinikum Leipzig übernahm die Validierung der 10 ausgewählten Fälle. Die Gegentestung/Homogenitätstestung übernahmen die Ludwig-Maximilians-Universität München (Panel 1) mit Prof. Dr. med. Frederick Klauschen als wissenschaftlichen Ansprechpartner und das Universitätsklinikum Regensburg (Panel 2) mit Prof. Dr. med. Matthias Evert als wissenschaftlichen Ansprechpartner. Den zwei Panelinstituten wurden jeweils fünf Fälle mit FFPE-Gewebe von Kolorektalkarzinomen (Fälle 1 – 5) sowie fünf Fälle mit endometrialen Karzinomen (Fälle 6 – 10) auf vier ungefärbten Objektträgern mit jeweils zwei Stenzen pro Fall zugesendet.

### 2.1 Methodenauswahl der Lead- und Panelinstitute

Die Lead- und Panelinstitute verwendeten unterschiedliche Methoden für den internen Ringversuch (Tab. 1). Die Gegentestung für MSH2 erfolgte mit den gleichen Antikörperklon von verschiedenen Herstellern.

**Tabelle 1: Methodenauswahl der Lead- und Panelinstitute**

	Lead	Panel 1	Panel 2
<b>Vorbehandlung</b>	CC1 (Roche/Ventana)	CC1 (Roche/Ventana)	TRIS
<b>Antikörper MLH1</b>	M1 (Roche)	ES05 (Leica)	G168-15 (BD)
<b>Antikörper MSH2</b>	G219-1129 (Roche)	G219-1129 (Roche)	G219-1129 (Cell Marque)
<b>Antikörper MSH6</b>	SP93 (Roche)	SP93 (Roche)	44 (BD)
<b>Antikörper PMS2</b>	EPR3947 (Roche)	A16-4 (Roche)	EPR3947 (Cell Marque)
<b>Plattform</b>	VENTANA BenchMark ULTRA (Roche/Ventana)	VENTANA BenchMark ULTRA (Roche/Ventana)	VENTANA BenchMark ULTRA (Roche/Ventana)
<b>Detektionssystem</b>	OptiView DAB IHC Detection (Roche/Ventana)	OptiView DAB IHC Detection (Roche/Ventana)	OptiView DAB IHC Detection (Roche/Ventana)

## 2.2 Ergebnisse des internen Ringversuchs

Die Ergebnisse des internen Ringversuchs waren bei allen drei Instituten bei allen 10 Fällen konkordant (Tab. 2a und 2b). Diese Fälle wurden im offenen Ringversuch verwendet.

**Tabelle 2a: Ergebnisse Interner Ringversuch Fall 1-7**

Fall		Lead	Panel 1	Panel 2
1	dMMR?	Nein	Nein	Nein
	MLH1*	Ja	Ja	Ja
	MSH2*	Ja	Ja	Ja
	MSH6*	Ja	Ja	Ja
	PMS2*	Ja	Ja	Ja
2	dMMR?	Ja	Ja	Ja
	MLH1*	Nein	Nein	Nein
	MSH2*	Ja	Ja	Ja
	MSH6*	Ja	Ja	Ja
	PMS2*	Nein	Nein	Nein
3	dMMR?	Ja	Ja	Ja
	MLH1*	Nein	Nein	Nein
	MSH2*	Ja	Ja	Ja
	MSH6*	Ja	Ja	Ja
	PMS2*	Nein	Nein	Nein
4	dMMR?	Nein	Nein	Nein
	MLH1*	Ja	Ja	Ja
	MSH2*	Ja	Ja	Ja
	MSH6*	Ja	Ja	Ja
	PMS2*	Ja	Ja	Ja
5	dMMR?	Ja	Ja	Ja
	MLH1*	Nein	Nein	Nein
	MSH2*	Ja	Ja	Ja
	MSH6*	Ja	Ja	Ja
	PMS2*	Nein	Nein	Nein
6	dMMR?	Ja	Ja	Ja
	MLH1*	Ja	Ja	Ja
	MSH2*	Ja	Ja	Ja
	MSH6*	Nein	Nein	Nein
	PMS2*	Ja	Ja	Ja
7	dMMR?	Nein	Nein	Nein
	MLH1*	Ja	Ja	Ja
	MSH2*	Ja	Ja	Ja
	MSH6*	Ja	Ja	Ja
	PMS2*	Ja	Ja	Ja

\*Liegt eine regelhafte (nicht pathologische) Expression vor?

**Tabelle 2b: Ergebnisse Interner Ringversuch Fall 8-10**

Fall		Lead	Panel 1	Panel 2
8	dMMR?	Ja	Ja	Ja
	MLH1*	Nein	Nein	Nein
	MSH2*	Ja	Ja	Ja
	MSH6*	Ja	Ja	Ja
	PMS2*	Nein	Nein	Nein
9	dMMR?	Nein	Nein	Nein
	MLH1*	Ja	Ja	Ja
	MSH2*	Ja	Ja	Ja
	MSH6*	Ja	Ja	Ja
	PMS2*	Ja	Ja	Ja
10	dMMR?	Ja	Ja	Ja
	MLH1*	Nein	Nein	Nein
	MSH2*	Ja	Ja	Ja
	MSH6*	Ja	Ja	Ja
	PMS2*	Nein	Nein	Nein

\*Liegt eine regelhafte (nicht pathologische) Expression vor?

### 3. Offener Ringversuch

Den Teilnehmern wurden fünf Fälle von Kolorektalkarzinomen (Fälle 1 – 5) und fünf Fälle endometrialen Karzinom (Fälle 6 – 10), auf vier ungefärbten Objektträgern mit jeweils zwei Stenzen pro Fall, im Zeitraum vom 02. bis 06. Mai 2022 gesendet.

#### 3.1 Zusammensetzung und Sollwerte des Probenmaterials

Die Zusammensetzung des Materials sowie die Sollwerte der Probensets befinden sich in Tabelle 3.

**Tabelle 3: Zusammensetzung und Sollwerte des Probenmaterials**

Fall	Gewebe	dMMR?	MLH1*	MSH2*	MSH6*	PMS2*
1	Kolonkarzinom	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
2		Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
3		Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
4		Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
5		Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
6	Endometriumkarzinom	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja
7		Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
8		Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
9		Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
10		Ja	Nein	Ja	Ja	Nein

\*Liegt eine regelhafte (nicht pathologische) Expression vor?

### 3.2 Bewertungskriterien

Die Teilnehmer sollten das Gewebematerial mittels immunhistochemischer Methoden auf das Vorhandensein einer Mismatch-Repair-Defizienz überprüfen. Dafür sollte die regelhafte, nicht pathologische Expression der DNA-Reparaturenzyme MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 im Tumorgewebe untersucht werden.

Die korrekte Identifikation einer Mismatch-Repair Defizienz (Frage 1) wurde pro Fall mit zwei Punkten bewertet. Bei 10 Fällen ergab sich daraus eine Gesamtpunktzahl von 20 Punkten. Für eine Erfolgreiche Teilnahme am Ringversuch waren 20 Punkte erforderlich.

Für die Bewertung der regelhaften Expression von MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 (Fragen 2 – 5) wurde je Fall ein Punkt für die richtige Antwort vergeben. Bei 10 Fällen ergab sich daraus eine Gesamtpunktzahl von 40 Punkten. Für eine erfolgreiche Teilnahme am Ringversuch waren mindestens 32 Punkte erforderlich.

Bei technischen Fehlern (Angabe „Technisch nicht auswertbar“) begutachtete das Leadinstitut im Nachhinein den Schnitt/die Schnitte und entschied individuell über die Punktevergabe, abhängig von der Ursache des Problems. Eine Begründung seitens der Teilnehmer war erforderlich.

### 3.3 Ergebnisse

Für den offenen dMMR Split 1 Ringversuch haben sich innerhalb der vorgegebenen Frist 51 Teilnehmer angemeldet. Nach Versand der Probensets hatten die Teilnehmer 10 Werkzeuge Zeit, die Ergebnisse ihrer Untersuchungen mitzuteilen.

Es haben alle 51 Teilnehmer ihre Ergebnisse eingereicht. Der Vergleich der 10 Fälle mit den Ergebnissen der Panelinstitute führte zu folgendem Ergebnis (die Sollwerte befinden sich in Tabelle 3):

Erfolgreiche Teilnahme insgesamt: 38 von 51 (75 %)

Jeweils sieben (14 %) Teilnehmer hatten Schwierigkeiten bei der Auswertung der Fälle 4 und 7 und haben Frage 1 abweichend vom Sollwert beantwortet.

Zwei (4 %) der Teilnehmer haben bei Fall 6 die Fragen 2 – 5 korrekt beantwortet. Diese Ergebnisse wurden falsch interpretiert und somit wurde Frage 1 abweichend vom Sollwert beantwortet.

**Tabelle 4: Fallbezogene Ergebniseinreichung der Teilnehmer**

	Angabe	Fall 1	Fall 2	Fall 3	Fall 4	Fall 5	Fall 6	Fall 7	Fall 8	Fall 9	Fall 10
dMMR?	Ja	0	<b>51</b>	<b>50</b>	7	<b>49</b>	<b>49</b>	5	<b>51</b>	0	<b>50</b>
	Nein	<b>50</b>	0	0	<b>44</b>	2	2	<b>44</b>	0	<b>51</b>	1
	TNA	1	0	1	0	0	0	2	0	0	0
MLH1	Ja	<b>50</b>	2	1	<b>48</b>	2	<b>51</b>	<b>49</b>	0	<b>51</b>	1
	Nein	0	<b>49</b>	<b>49</b>	2	<b>49</b>	0	1	<b>51</b>	0	<b>50</b>
	TNA	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0
MSH2	Ja	<b>51</b>	<b>50</b>	<b>51</b>	<b>43</b>	<b>49</b>	<b>50</b>	<b>48</b>	<b>51</b>	<b>51</b>	<b>50</b>
	Nein	0	1	0	6	2	1	2	0	0	1
	TNA	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0
MSH6	Ja	<b>51</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>48</b>	<b>50</b>	0	<b>47</b>	<b>51</b>	<b>51</b>	<b>51</b>
	Nein	0	1	1	3	1	<b>51</b>	3	0	0	0
	TNA	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
PMS2	Ja	<b>51</b>	0	0	<b>47</b>	2	<b>51</b>	<b>46</b>	0	<b>51</b>	1
	Nein	0	<b>51</b>	<b>50</b>	3	<b>49</b>	0	3	<b>51</b>	0	<b>50</b>
	TNA	0	0	1	1	0	0	2	0	0	0

Die Sollwerte sind in fetter Schrift angegeben. Die als richtig bewerteten Antworten sind grau schattiert.  
TNA: Technisch nicht auswertbar

### 3.4 Methodische Angaben der Teilnehmer

Die zugrundeliegende Methodik der einzelnen Färbungen wurde bei den Teilnehmern abgefragt. Dabei wurde aufgrund der Komplexität einmal nach der Vorbehandlung, dem verwendeten Detektionssystem und der Plattform gefragt und spiegelt ggf. nicht alle individuellen Protokolle der einzelnen Analysen wider. Es wurde nicht zwischen LDT und IVD Protokollen unterschieden. Aufgrund der Komplexität der Färbungen sowie Analysen und der Vielzahl an verschiedenen Protokollen ist es nicht sinnvoll allgemeingültige Rückschlüsse auf einzelne Methoden, Plattformen und Antikörper zu ziehen.

Die Teilnehmer verwendeten unterschiedliche Vorbehandlungen für die Immunhistochemie (Tab. 5).

**Tabelle 5: Von den Teilnehmern verwendete Vorbehandlungen**

Hersteller	Vorbehandlung	Teilnehmer	mit Erfolg (%)
Agilent/Dako	Target Retrieval Solution, High pH	16	13 (81)
Roche/Ventana	Ultra CC1	12	9 (75)
Leica	Bond Epitope	7	5 (71)
-	Citrat-Puffer	6	3 (50)
Roche/Ventana	CC1	6	6 (100)
-	EDTA	5	3 (60)
Agilent/Dako	Target Retrieval Solution, Citrate pH 6.1	1	0 (0)
Roche/Ventana	Ultra CC2	1	1 (100)

Die verwendeten Antikörper zum Nachweis der einzelnen Mismatch-Repair-Proteine wurden sowohl nach dem jeweiligen Klon, als auch nach der Herstellerfirma unterschieden, um eventuelle Unterschiede im zur Anwendung kommenden Antikörper gerecht zu werden.

Die häufigsten verwendeten Antikörper zum Nachweis des MLH1-Proteins waren die Klone ES05 von der Firma Agilent/Dako (19 Teilnehmer, 37 %), M1 von der Firma Roche (16 Teilnehmer, 31 %) und ES05 von der Firma Leica (6 Teilnehmer, 12 %) (Tab. 6).

**Tabelle 6: Von den Teilnehmern verwendete MLH1 Antikörper**

Hersteller	Antikörper/Klon MLH1	Teilnehmer	mit Erfolg (%)
Agilent/Dako	ES05	19	14 (74)
Roche	M1	16	14 (88)
Leica	ES05	6	4 (67)
Cell Marque	G168-728	5	4 (80)
BD	G168-15	2	1 (50)
medac diagnostika	BS29	1	1 (100)
Zytomed	G168-15	1	0 (0)
BD Biosciences	G168-728	1	0 (0)

Die häufigsten verwendeten Antikörper zum Nachweis des MSH2-Proteins waren die Klone G2219-1129 von der Firma Roche (16 Teilnehmer, 31 %), FE11 von der Firma Agilent/Dako (16 Teilnehmer, 31 %) und G2219-1129 von der Firma Cell Marque (5 Teilnehmer, 10 %) (Tab. 7).

**Tabelle 7: Von den Teilnehmern verwendete MSH2 Antikörper**

Hersteller	Antikörper/Klon MSH2	Teilnehmer	mit Erfolg (%)
Roche	G219-1129	16	14 (88)
Agilent/Dako	FE11	16	12 (75)
Cell Marque	G219-1129	5	2 (40)
Leica	79H11	3	2 (67)
medac diagnostika	G219-1129	2	2 (100)
BD Biosciences	G219-1129	2	1 (50)
Zytomed	FE11	2	0 (0)
Leica	25D12	1	1 (100)
DCS	25D12	1	1 (100)
Epitomics	RED2	1	1 (100)
DCS	SP46	1	1 (100)
Immunologic	G219-1129	1	1 (100)

Die häufigsten verwendeten Antikörper zum Nachweis des MSH6-Proteins waren die Klone EP49 von der Firma Agilent/Dako (17 Teilnehmer, 33 %), SP39 von der Firma Roche (13 Teilnehmer, 25 %) und 44 von der Firma DCS (4 Teilnehmer, 8 %) (Tab. 8).



**Tabelle 8: Von den Teilnehmern verwendete MSH6 Antikörper**

Hersteller	Antikörper/Klon MSH6	Teilnehmer	mit Erfolg (%)
Agilent/Dako	EP49	17	12 (71)
Roche	SP93	13	11 (85)
DCS	44	4	3 (75)
Cell Marque	44	3	3 (100)
DCS	SP93	3	3 (100)
Leica	EP49	3	2 (67)
Epitomics	EP49	2	1 (50)
Cell Marque	SP93	2	1 (50)
BioSB	EP49	1	1 (100)
Menarini	44	1	1 (100)
BD Biosciences	44	1	0 (0)
Zytomed	44	1	0 (0)

Die häufigsten verwendeten Antikörper zum Nachweis des PMS2-Proteins waren die Klone EP51 von der Firma Agilent/Dako (17 Teilnehmer, 33 %), A16-4 von der Firma Roche (16 Teilnehmer, 31 %) und A16-4 von der Firma Zytomed (7 Teilnehmer, 14 %) (Tab. 9).

**Tabelle 9: Von den Teilnehmern verwendete PMS2 Antikörper**

Hersteller	Antikörper/Klon PMS2	Teilnehmer	mit Erfolg (%)
Agilent/Dako	EP51	17	12 (71)
Roche	A16-4	16	14 (88)
Zytomed	A16-4	7	3 (43)
Leica	EP51	3	2 (67)
Cell Marque	MRQ-28	2	2 (100)
BioSB	EP51	2	1 (50)
BD Biosciences	A16-4	1	1 (100)
Epitomics	EP51	1	1 (100)
Cell Marque	EPR3947	1	1 (100)
Roche	EPR3947	1	1 (100)

Die Teilnehmer färbten die Schnitte am häufigsten mit dem VENTANA BenchMark ULTRA von der Firma Roche/Ventana (16 Teilnehmer, 31 %), dem Bond III von der Firma Leica (10 Teilnehmer, 20 %) und dem Dako Link 48 von der Firma Agilent/Dako (9 Teilnehmer, 18 %) (Tab. 10).

**Tabelle 10: Von den Teilnehmern verwendete Färbegeräte**

Hersteller	Plattform/Gerät	Teilnehmer	mit Erfolg (%)
Roche/Ventana	VENTANA BenchMark ULTRA	16	12 (71)
Leica	Bond-III	10	6 (60)
Agilent/Dako	Dako Link 48	9	6 (67)
Agilent/Dako	Dako Omnis	6	6 (100)
Roche/Ventana	VENTANA BenchMark XT	3	3 (100)
-	manuelle Färbung	2	1 (50)
Leica	Bond-MAX	1	1 (100)
Roche/Ventana	VENTANA BenchMark GX	1	1 (100)
Thermo Fisher	Lab Vision™ Autostainer 360	1	1 (100)
Thermo Fisher	Lab Vision™ Autostainer 480	1	1 (100)
Zytomed	IntelliPATH	1	0 (0)

Die Teilnehmer färbten die Schnitte am häufigsten mit dem VENTANA BenchMark ULTRA von der Firma Roche/Ventana (16 Teilnehmer, 31 %), dem Bond III von der Firma Leica (10 Teilnehmer, 20 %) und dem Dako Link 48 von der Firma Agilent/Dako (9 Teilnehmer, 18 %) (Tab. 11).

**Tabelle 11: Von den Teilnehmern verwendete Detektionssysteme**

Hersteller	Detektionssystem	Teilnehmer	mit Erfolg (%)
Leica	Bond Polymer Refine Detection	11	7 (64)
Roche/Ventana	OptiView DAB IHC Detection	10	9 (90)
Agilent/Dako	EnVision FLEX, High pH	9	8 (89)
Roche/Ventana	ultraView Universal DAB Detection Kit	8	6 (75)
Agilent/Dako	EnVision FLEX HRP DAB	7	4 (57)
Zytomed	ZytoChem Plus (AP) Polymer Kit	2	2 (100)
Roche/Ventana	ultraView Universal AP Red Detection Kit	2	1 (50)
Medac	Colour Bright Vision	1	1 (100)
Zytomed	Zytochem Plus (HRP) Kit	1	0 (0)

### 3.5 Ungewöhnliche Vorkommnisse

Es gab keine ungewöhnlichen Vorkommnisse im dMMR Split 1 2022 Ringversuch.

## 4. Schlussfolgerung

Die Erfolgsquote des Ringversuchs dMMR Split 1 2022 von 75 % ist im Vergleich zum vorherigen Ringversuch dMMR 2021 (82 %) etwas geringer ausgefallen (Tab. 12). Die Fehlerquellen bei nicht erfolgreichen Teilnehmern waren neben Färbeproblemen auch Interpretationsschwierigkeiten. Häufigste Färbeprobleme schienen eine zu schwache nukleäre Reaktivität bzw. ein zu starker zytoplasmatischer Hintergrund zu sein. Hilfreich bei den Endometriumkarzinomen ist immer die interne Positivkontrolle des miterfassten Stromas. Grundsätzlich sollten mindestens 10 % der Tumorzellen eine nukleäre Färbereaktion für die dMMR-Proteine zeigen um als regelhafte Expression gewertet zu werden.

Darüber hinaus möchten wir darauf hinweisen, dass der Expressionsverlust eines einzelnen dMMR-Proteins (vor allem PMS2 oder MSH6) auftreten kann (Fall 6). Solche Fälle sind auch als MMR-defizient zu werten.

**Tabelle 12: Erfolgsquoten der dMMR Ringversuche 2018-2022**

<b>Jahr</b>	<b>Teilnahmen</b>	<b>erfolgreiche Teilnahme (%)</b>
2018	123	84*
2019	97	84*
2020	101	90*
2021	98	82*
2022	51 (Split 1)	75

\*Mittelwerte aus Split 1 und 2


**Bericht:**

Signaturdatum: 9/15/2022 | 10:01 AM MESZ


DocuSigned by:  
  
6C990741B5E44EA...  
Pascal Naschenweng  
Projektmanagement

**Freigabe:**

Signaturdatum: 9/15/2022 | 10:10 AM MESZ

DocuSigned by:  
  
C4448EE87344446...  
Prof. Dr. med. K. Jöhrens  
Medizinische Beratung

Signaturdatum: 9/15/2022 | 10:13 AM MESZ

DocuSigned by:  
  
1F8C182C8DC147F...  
Dr. rer. nat. M. Grassow-Narlik  
Qualitätsmanagement