

Ringversuchsbericht  
Homozygote  
*CDKN2A/B*-Deletion  
in Gliomen  
(MoIPath) 2022

## Inhaltsverzeichnis

1. Kontaktdaten und Unteraufträge.....	3
2. Interner Ringversuch .....	3
2.1 Methodenauswahl der Leadpanel- und Panelinstitute .....	3
2.2 Ergebnisse des internen Ringversuchs .....	5
3. Offener Ringversuch .....	6
3.1 Zusammensetzung und Sollwerte des Probenmaterials .....	6
3.2 Bewertungskriterien.....	6
3.3 Ergebnisse .....	7
3.4 Methodische Angaben der Teilnehmer .....	7
3.5 Ungewöhnliche Vorkommnisse .....	13
4. Schlussfolgerung.....	14

## 1. Kontaktdaten und Unteraufträge

Der Ringversuch (RV) Homozygote *CDKN2A/B*-Deletion in Gliomen (MoIPath) 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 Homozygote *CDKN2A/B*-Deletion in Gliomen (MoIPath) 2022 Ringversuchs übernahm Herr Prof. Dr. med. Markus J. Riemenschneider vom Universitätsklinikum Regensburg:

Abteilung für Neuropathologie  
Universitätsklinikum Regensburg  
Franz-Josef-Strauß-Allee 11  
93053 Regensburg

Zudem übernahm das Leadpanelinstitut folgende Arbeiten im Unterauftrag: Materialauswahl und Testsetzusammenstellung (inkl. Schneiden, Kontrolltestung und den internen Ringversuch).

## 2. Interner Ringversuch

Für den internen Ringversuch wurden 12 Fälle zusammengestellt. Das Universitätsklinikum Regensburg übernahm die Validierung der 12 ausgewählten Fälle. Die Gegentestung übernahmen die Charité-Universitätsmedizin Berlin (Panelinstitut 1) mit Prof. Dr. med. David Capper als wissenschaftlichem Ansprechpartner und das Universitätsklinikum Heidelberg (Panelinstitut 2) mit Prof. Dr. med. Felix Sahm als wissenschaftlichem Ansprechpartner. Den zwei Panelinstituten wurden jeweils 12 Fälle mit FFPE-Gewebe von Gliomen zugesendet. Je Fall haben sie vier Leerschnitte á 5 µm für die HE-Färbung und Nukleinsäure-Extraktion erhalten.

### 2.1 Methodenauswahl der Leadpanel- und Panelinstitute

Die vom Leadpanel- und den Panelinstituten im internen Ringversuch eingesetzten Methoden, Assays und Geräte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Methodenauswahl der Leadpanel- und Panelinstitute

	Leadpanelinstitut (Regensburg)	Panelinstitut 1 (Berlin)	Panelinstitut 2 (Heidelberg)
<b>Mikrodissektion durchgeführt bei folgenden Fällen</b>	P1-12	Keine Mikrodissektion	P1,P2, P5-P7, P9, P11, P12
<b>DNA-Extraktionsmethode</b>	Automatisiert	Automatisiert	Automatisiert
<b>DNA-Extraktionskit</b>	Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit (Promega)	Maxwell® RSC DNA FFPE Kit (Promega)	Maxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit (Promega)
<b>DNA-Konzentrationsbestimmung</b>	Fluorometrisch	Fluorometrisch	Fluorometrisch
<b>DNA-Qualitätsbestimmung</b>	Qubit™ 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific)	Quantus™ Fluorometer (Promega)	FLUOstar® Omega (BMG Labtech)
<b>DNA-Qualitätskontrolle</b>	Keine DNA-Qualitätskontrolle	Keine DNA-Qualitätskontrolle	Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)
<b>Methode für den <i>CDKN2A/B</i>-Deletionsnachweis</b>	Parallelesequenzierung (NGS) / Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)	DNA-Methylierungsanalyse	DNA-Methylierungsanalyse
<b>Gerät oder Plattform für den <i>CDKN2A/B</i>-Deletionsnachweis</b>	MiniSeq (Illumina) / Biometra TAdvanced Twin Thermocycler (Analytik Jena)	iScan System (Illumina)	iScan System (Illumina)
<b>Assay für den <i>CDKN2A/B</i>-Deletionsnachweis</b>	NGS: Custom Design DNA Panel inkl. <i>CDKN2A</i> und <i>CDKN2B</i> (Lorenz et al. (2020), HaloPlex Assay (Agilent)) / MLPA: SALSA® MLPA® Probemix P088-D1 Oligodendroglioma 1p-19q (MRC Holland)	Infinium Methylation EPIC BeadChip Kit (Illumina)	Infinium Methylation EPIC BeadChip Kit (Illumina)
<b>Software für die Datenanalyse</b>	NGS: Custom made scripts for sequencing / MLPA: Coffalyser.Net™ MLPA Analysis Software (MRC Holland)	iScan Control Software v3.4.7 (Illumina) + BeadArray Controls Reporter (Illumina)	R-Tools

## 2.2 Ergebnisse des internen Ringversuchs

Der vom Leadpanel- und den Panelinstituten ermittelten *CDKN2A/B*-Deletionsstatus der Fälle aus dem internen Ringversuch ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Ergebnisse des internen Ringversuchs (Leadpanel- und Panelinstitute)**

	<b>Leadpanelinstitut (Regensburg)</b>	<b>Panelinstitut 1 (Berlin)</b>	<b>Panelinstitut 2 (Heidelberg)</b>
<b>Fall 1</b>	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion
<b>Fall 2</b>	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion
<b>Fall 3</b>	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion
<b>Fall 4</b>	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion
<b>Fall 5</b>	<b>Homozygote <i>CDKN2A</i>- und <i>CDKN2B</i>-Deletion</b>	<b>Homozygote <i>CDKN2A</i>- und <i>CDKN2B</i>-Deletion</b>	<b>Homozygote <i>CDKN2A</i>- und <i>CDKN2B</i>-Deletion</b>
<b>Fall 6</b>	<b>Homozygote <i>CDKN2A</i>- und <i>CDKN2B</i>-Deletion</b>	<b>Homozygote <i>CDKN2A</i>- und <i>CDKN2B</i>-Deletion</b>	<b>Homozygote <i>CDKN2A</i>- und <i>CDKN2B</i>-Deletion</b>
<b>Fall 7</b>	<b>Homozygote <i>CDKN2A</i>- und <i>CDKN2B</i>-Deletion</b>	<b>Homozygote <i>CDKN2A</i>- und <i>CDKN2B</i>-Deletion</b>	<b>Homozygote <i>CDKN2A</i>- und <i>CDKN2B</i>-Deletion</b>
<b>Fall 8</b>	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion
<b>Fall 9</b>	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion
<b>Fall 10</b>	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion (heterozygote Deletion)	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion (heterozygote Deletion)	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion
<b>Fall 11</b>	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion
<b>Fall 12</b>	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion

Bei allen 12 Fällen waren die Ergebnisse der drei Institute konkordant. Zwei der Institute hatten bei Fall 10 zusätzlich eine heterozygote *CDKN2A/B*-Deletion detektiert.

Zeitgleich wurden dieselben Fälle im internen Ringversuch Homozygote *CDKN2A/B*-Deletion in Gliomen (ISH) 2022 getestet. Interessanterweise wurde von einem der Panelinstitute die homozygote *CDKN2A/B*-Deletion in Fall 7 nicht detektiert und das andere Panelinstitut hatte Fall 10 als homozygot deletiert detektiert. Weiter haben beide ISH-Panelinstitute viel mehr heterozygote Fälle beschrieben als die Institute, welche molekularpathologische Methoden eingesetzt hatten. Diese Diskrepanzen in den Ergebnissen könnten mit den Limitationen der MolPath- bzw. FISH-Methodik erklärbar sein.

### 3. Offener Ringversuch

Den Teilnehmern wurden acht Fälle mit jeweils vier ungefärbten Objektträgern á 5 µm mit Gewebeschnitten (einer für die HE-Färbung und drei für die Nukleinsäure-Extraktion) vom 13.06. bis 17.06.2022 zugesendet.

#### 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**

Fallnummer Offener RV	Fallnummer Interner RV	Gewebe	Homozygoter <i>CDKN2A/B</i> -Deletionsstatus
1	1	Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert (ZNS-WHO-Grad 3)	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion
2	3	Astrozytom, IDH-mutiert (ZNS-WHO-Grad 3)	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion
3	4	Oligodendrogliom, IDH-mutiert und 1p/19q-kodeletiert (ZNS-WHO-Grad 3)	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion
4	5	pädiatrisches astrozytäres high-grade Gliom, NEC	<b>Homozygote</b> <i>CDKN2A</i> - und <i>CDKN2B</i> -Deletion
5	6	Glioblastom, IDH-Wildtyp (ZNS-WHO-Grad 4)	<b>Homozygote</b> <i>CDKN2A</i> - und <i>CDKN2B</i> -Deletion
6	7	Glioblastom, IDH-Wildtyp (ZNS-WHO-Grad 4)	<b>Homozygote</b> <i>CDKN2A</i> - und <i>CDKN2B</i> -Deletion
7	8	Astrozytom, IDH-mutiert (ZNS-WHO-Grad 3)	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion
8	10	Astrozytom, IDH-mutiert (ZNS-WHO-Grad 4)	Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletion (heterozygot)

#### 3.2 Bewertungskriterien

Die Teilnehmer sollten in dem Gewebematerial den *CDKN2A/B*-Deletionsstatus bestimmen. Bezüglich des verwendeten Assays bestand Methodenfreiheit. Folgende Auswertekategorien waren möglich:

- A) Nur homozygote *CDKN2A*-Deletion
- B) Nur homozygote *CDKN2B*-Deletion
- C) Homozygote *CDKN2A*- und *CDKN2B*-Deletion
- D) Keine homozygote *CDKN2A/B*-Deletion
- E) Nicht auswertbar

Pro richtiger Bestimmung des *CDKN2A/B*-Deletionsstatus einer Ringversuchsprobe („Welcher *CDKN2A/B*-Deletionsstatus liegt vor?“) wurden zwei Punkte vergeben. Bei acht Fällen ergab sich daraus eine Gesamtpunktzahl von 16 Punkten. Wurde ein Fall als „Nicht auswertbar“ bewertet, so wurde dieser Fall mit einem Punkt bewertet. Diese Möglichkeit konnte nur einmal verwendet werden, außer in begründeten Ausnahmefällen. Der Ringversuch war mit 15 Punkten oder mehr bestanden (95 %).

### 3.3 Ergebnisse

Für den offenen Homozygote *CDKN2A/B*-Deletion in Gliomen (MoPath) 2022 Ringversuch haben sich innerhalb der vorgegebenen Frist 14 Teilnehmer angemeldet. Nach Versand der Probensets hatten die Teilnehmer 10 Werkzeuge Zeit, die Ergebnisse ihrer Untersuchungen zurückzumelden.

Die Teilnehmer sollten aus den Paraffinschnitten zunächst die DNA isolieren und anschließend mittels molekularpathologischer Methoden den Nachweis einer homozygoten *CDKN2A/B*-Deletion durchführen. Die Methoden konnten von den teilnehmenden Instituten frei gewählt werden. 13 von 14 Teilnehmern haben ihre Ergebnisse eingereicht.

Erfolgreiche Teilnahme insgesamt: **11 von 13 (85 %)**

Die eingereichten Ergebnisse der Teilnehmer sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4: Fallbezogene Ergebniseinreichung der Teilnehmer**

	Fall 1	Fall 2	Fall 3	Fall 4	Fall 5	Fall 6	Fall 7	Fall 8
<b>Nur homozygote <i>CDKN2A</i>-Deletion</b>	0	0	0	1	1	1	0	0
<b>Nur homozygote <i>CDKN2B</i>-Deletion</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Homozygote <i>CDKN2A</i> und <i>CDKN2B</i>-Deletion</b>	0	0	0	12	12	12	0	1
<b>Keine homozygote <i>CDKN2A/B</i>-Deletion</b>	13	13	13	0	0	0	13	11
<b>Nicht auswertbar</b>	0	0	0	0	0	0	0	1

Die Tabelle zeigt die entsprechende Anzahl der Teilnehmer, welche die entsprechende Antwort gewählt haben. Die richtige Antwort ist in fetter Schrift und grau schattiert angegeben.

Zusätzlich wurde als optionale Frage der heterozygote *CDKN2A/B*-Deletionsstatus der Proben abgefragt. Sieben Teilnehmer (54 %) haben Fall 8 als heterozygot deletiert für *CDKN2A* und *CDKN2B* angegeben und ein Teilnehmer hat bei Fall 8 sowie Fall 3 eine heterozygote *CDKN2A/B*-Deletion nachgewiesen.

### 3.4 Methodische Angaben der Teilnehmer

Eine Mikrodissektion vor DNA-Extraktion wurde von 85 % (11/13) der Teilnehmer durchgeführt. In Tabelle 5 ist angegeben, wie häufig die einzelnen Fälle mikrodisseziert wurden.

**Tabelle 5: Von den Teilnehmern mikrodissizierte Fälle**

Fälle, bei denen eine Mikrodissektion durchgeführt wurde	Teilnehmer
Fall 1	11
Fall 3	10
Fall 5	8
Fall 6	8
Fall 8	8
Fall 2	7
Fall 4	7
Fall 7	7

Für die Isolation der DNA aus den Paraffinschnitten haben die Teilnehmer automatisierte sowie manuelle Verfahren eingesetzt, wobei die meisten Teilnehmer (69 %) die DNA automatisiert extrahiert haben (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Von den Teilnehmern verwendete Methoden für die DNA-Extraktion**

Methode für die DNA-Extraktion	Teilnehmer	mit Erfolg (%)
Automatisiert	9	8 (89)
Manuell	4	3 (75)

Die Teilnehmer haben für die DNA-Extraktion verschiedene Kits verwendet (Tabelle 7), wobei am häufigsten das Maxwell® RSC DNA FFPE Kit und das Maxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit (jeweils 23 %) der Firma Promega verwendet wurden.

**Tabelle 7: Von den Teilnehmern verwendete DNA-Extraktionskits**

Hersteller	DNA-Extraktionskit	Teilnehmer	mit Erfolg (%)
Covaris®	truXTRAC FFPE DNA Kit	1	1 (100)
IST Innuscreen	blackPREP FFPE DNA Kit	1	0 (0)
Promega	Maxwell® 16 FFPE PLUS LEV DNA Purification Kit	1	1 (100)
	Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Kit	1	1 (100)
	Maxwell® CSC DNA FFPE Kit	1	1 (100)
	Maxwell® RSC DNA FFPE Kit	3	3 (100)
	Maxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit	3	2 (67)
Qiagen	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	2	2 (100)

Um die Konzentration der isolierten DNA zu bestimmen, wurden von den Teilnehmern am häufigsten (69 %) fluorometrische Verfahren eingesetzt. Alle eingesetzten Methoden sind in Tabelle 8 aufgelistet.

**Tabelle 8: Von den Teilnehmern verwendete Methoden für die DNA-Konzentrationsbestimmung**

Methoden für die DNA-Konzentrationsbestimmung	Teilnehmer	mit Erfolg (%)
Fluorometrisch (z.B. Qubit™, Quantus™ etc.)	9	8 (89)
Spektrophotometrisch (z.B. NanoDrop™ etc.)	2	1 (50)
Fluorometrisch (z.B. Qubit™, Quantus™ etc.) + spektrophotometrisch (z.B. NanoDrop™ etc.)	1	1 (100)
qPCR	1	1 (100)

Die meisten Teilnehmer (54 %) haben für die Bestimmung der DNA-Konzentration die Qubit™ Fluorometer der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Eine Übersicht aller Geräte, die im Ringversuch Anwendung gefunden haben, ist in Tabelle 9 gegeben.

**Tabelle 9: Von den Teilnehmern verwendete Geräte für die DNA-Konzentrationsbestimmung**

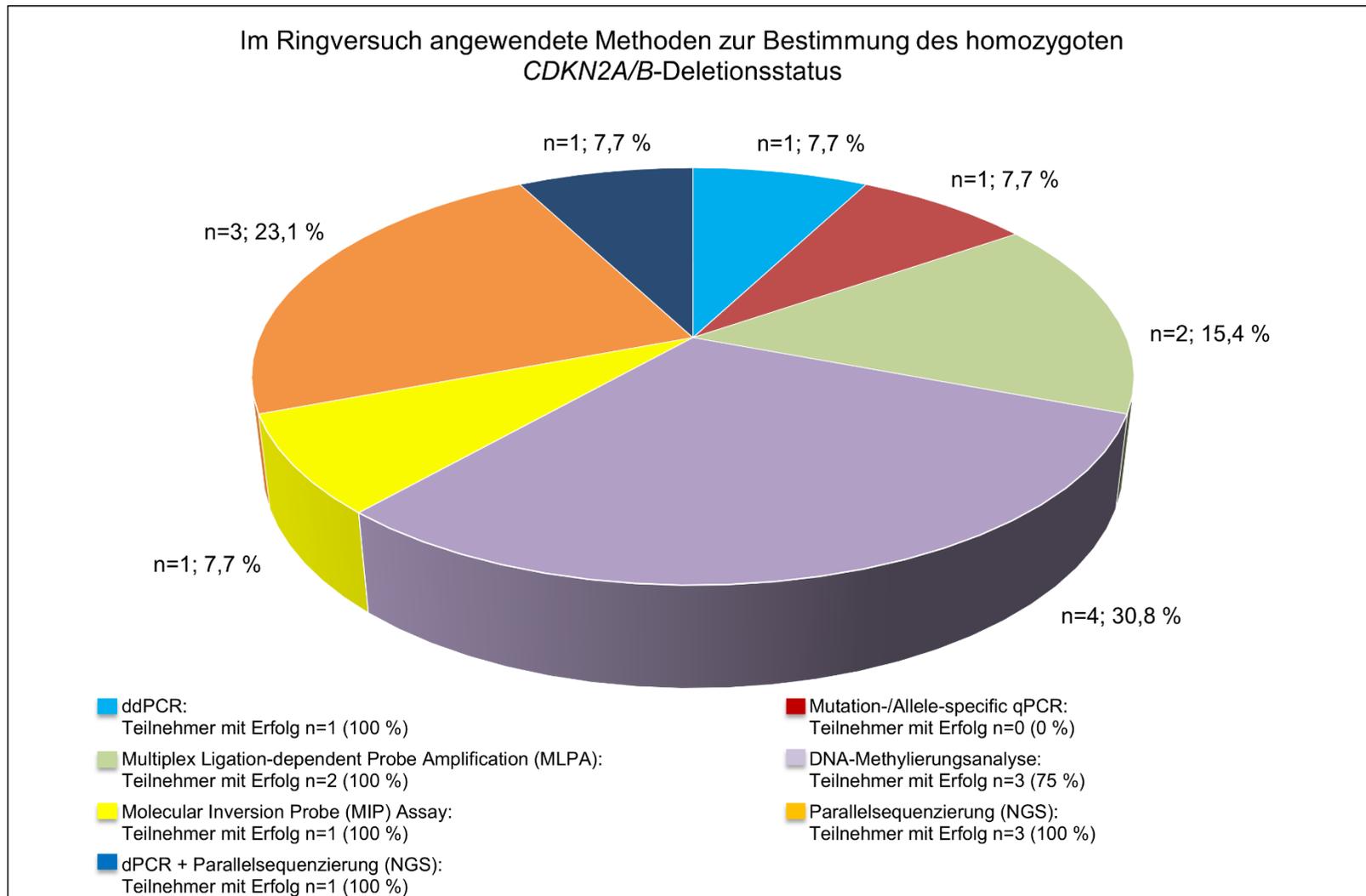
Methoden	Hersteller	Gerät für die DNA-Konzentrationsbestimmung	Teilnehmer	mit Erfolg (%)
Fluorometrisch	Thermo Fisher Scientific	Qubit™ Fluorometer	7	6 (86)
	Promega	Quantus™ Fluorometer	2	2 (100)
Spektrophotometrisch	Thermo Fisher Scientific	NanoDrop™ Spektralphotometer	2	1 (50)
Fluorometrisch + spektrophotometrisch	Promega + Thermo Fisher Scientific	Quantus™ Fluorometer + NanoDrop™ Spektralphotometer	1	1 (100)
qPCR	Roche	LightCycler® 480 System II	1	1 (100)

Die Qualität der isolierten DNA wurde von den meisten Teilnehmer (62 %) nicht bestimmt. In Tabelle 10 sind die Methoden, welche die restlichen Teilnehmer (38 %) zur DNA-Qualitätskontrolle eingesetzt haben, aufgelistet.

**Tabelle 10: Von den Teilnehmern verwendete Methoden für die DNA-Qualitätskontrolle**

Methoden für die DNA-Qualitätskontrolle	Teilnehmer	mit Erfolg (%)
Elektrophoretisch	1	1 (100)
Spektrophotometrisch	2	2 (100)
qPCR	2	1 (50)
Keine DNA-Qualitätskontrolle durchgeführt	8	7 (88)

Um den homozygoten *CDKN2A/B*-Deletionsstatus in den Fällen zu bestimmen, wurde von den Teilnehmern eine Vielzahl von Methoden oder Methodenkombinationen angewendet. In Abb. 1 ist die Verteilung der zum Einsatz gekommenen Methoden graphisch dargestellt. Am häufigsten (31 %, 4/13) wurde der *CDKN2A/B*-Deletionsstatus mittels DNA-Methylierungsanalyse erhoben.



**Abb. 1: Von den Teilnehmern eingesetzte Methoden für die homozygote *CDKN2A/B*-Deletionsanalyse:** Die Zahlen im Diagramm entsprechen der Anzahl (n) der Teilnehmer, welche die entsprechende Methode zur Fusionsbestimmung gewählt haben; die Prozentangabe zeigt den Anteil dieser Teilnehmer von der Gesamtteilnehmerzahl. In der Legende sind zusätzlich pro Methode die Anzahl und Prozentangabe der Teilnehmer mit Erfolg angegeben.

Um den homozygoten *CDKN2A/B*-Deletionsstatus zu ermitteln haben die Teilnehmer verschiedene Kits und Panel eingesetzt, welche in Tabelle 11 zusammengefasst sind.

**Tabelle 11: Von den Teilnehmern (TN) eingesetzte Kits / Panels für die homozygote *CDKN2A/B*-Deletionsanalyse**

Methode	Hersteller	Kit / Panel für die homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletionsanalyse	TN	mit Erfolg (%)
ddPCR	Bio-Rad	CN Determination Assay dHsaCP1000581 für <i>CDKN2A</i>	1	1 (100)
Mutations-/Allel-spezifische qPCR	ABI/Thermo Fisher Scientific	TaqMan® Hs00237642_cn Assay für <i>CDKN2A</i> + TaqMan® Hs03712084 <i>CDKN2A</i> Assay	1	0 (0)
Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)	MRC Holland	SALSA® MLPA® Probemix P088-D1 Oligodendroglioma 1p-19q	1	1 (100)
		SALSA® MLPA® Probemix P419-B1 <i>CDKN2A/2B-CDK4</i>	1	1 (100)
DNA-Methylierungsanalyse	Illumina	Infinium Methylation EPIC BeadChip Kit	4	3 (75)
Molecular Inversion Probe (MIP) Assay	ABI/Thermo Fisher Scientific	OncoScan™ CNV Plus Assay	1	1 (100)
Parallelsequenzierung (NGS)	Agilent	Custom Hybridisation Panel (inkl. <i>CDKN2A</i> und <i>CDKN2B</i> ) + SureSelect XT HS RevB, ILM	1	1 (100)
	Qiagen	QIASeq Targeted DNA Custom Panel (inkl. <i>CDKN2A</i> und <i>CDKN2B</i> )	1	1 (100)
	Thermo Fisher Scientific	OncoPrint™ Comprehensive Assay v3	1	1 (100)
Digitale PCR (dPCR) + Parallelsequenzierung (NGS)	ABI/Thermo Fisher Scientific	AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel v3 for Illumina® + TaqMan® Hs01354804_cn Assay für <i>CDKN2A</i>	1	1 (100)

Zur Bestimmung des homozygoten *CDKN2A/B*-Deletionsstatus haben die Teilnehmer verschiedene Geräte/Plattformen eingesetzt, welche in Tabelle 12 aufgelistet sind.

**Tabelle 12: Von den Teilnehmern (TN) eingesetzte Geräte / Plattformen für die homozygote *CDKN2A/B*-Deletionsanalyse**

Methode	Hersteller	Kit / Panel für die homozygote <i>CDKN2A/B</i> -Deletionsanalyse	TN	mit Erfolg (%)
ddPCR	Bio-Rad	QX200 Droplet Digital PCR System	1	1 (100)
Mutations-/Allel-spezifische qPCR	Roche	LightCycler® 480 System	1	0 (0)
Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)	ABI/Thermo Fisher Scientific	3500 Dx Series Genetic Analyzer	1	1 (100)
	Beckman Coulter	CEQ™ 8000 Genetic Analysis System	1	1 (100)
DNA-Methylierungsanalyse	Illumina	iScan System	2	1 (50)
		NextSeq	2	2 (100)
Molecular Inversion Probe (MIP) Assay	ABI/Thermo Fisher Scientific	GeneChip Scanner 3000 7G System	1	1 (100)
Parallelsequenzierung (NGS)	Thermo Fisher Scientific	Ion GeneStudio S5	1	1 (100)
	Illumina	MiSeq	2	2 (100)
Digitale PCR (dPCR) + Parallelsequenzierung (NGS)	ABI/Thermo Fisher Scientific	Ion GeneStudio S5 + QuantStudio™ 3D Digital PCR System	1	1 (100)

Für die Auswertung der erhobenen Daten haben die Teilnehmer verschiedene Software-Lösungen angewendet, welche in Tabelle 15 angegeben sind.

**Tabelle 15: Von den Teilnehmern (TN) eingesetzte Software für die Datenanalyse**

Methode	Hersteller	Software für die Datenanalyse	TN	mit Erfolg (%)
ddPCR	Bio-Rad	QuantaSoft Software	1	1 (100)
Mutations-/Allel-spezifische qPCR	Roche	LightCycler® 480 Software	1	0 (0)
Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)	MRC Holland	Coffalyser.Net™ MLPA Analysis Software	2	2 (100)
DNA-Methylierungsanalyse	-	Bioinformatisches R-Paket "conumee" über <a href="http://www.moleculareuropathology.org">www.moleculareuropathology.org</a>	1	0 (0)
	-	<a href="https://www.moleculareuropathology.org/mnp/">https://www.moleculareuropathology.org/mnp/</a>	2	2 (100)
	-	<a href="https://www.moleculareuropathology.org/mnp/">https://www.moleculareuropathology.org/mnp/</a> + Integrative Genome Viewer (Broad Institute)	1	1 (100)
Molecular Inversion Probe (MIP) Assay	BioDiscovery + ABI/Thermo Fisher Scientific	Nexus Copy Number Version 8 + Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software	1	1 (100)
Parallelsequenzierung (NGS)	-	CNVkit Version 0.9.8	1	1 (100)
	Qiagen	CLC Genomics Workbench	1	1 (100)
	Thermo Fisher Scientific	Ion Reporter™ Software	1	1 (100)
Digitale PCR (dPCR) + Parallelsequenzierung (NGS)	ABI/Thermo Fisher Scientific	Ion Reporter™ Software + Torrent Suite™ Software + QuantStudio™ 3 and 5 Real-Time PCR System Software	1	1 (100)

### 3.5 Ungewöhnliche Vorkommnisse

Es gab keine ungewöhnlichen Vorkommnisse im Ringversuch Homozygote *CDKN2A/B*-Deletion in Gliomen (MolPath) 2022.

#### 4. Schlussfolgerung

Die QUIP GmbH hat im Jahr 2022 erstmalig den Ringversuch Homozygote *CDKN2A/B*-Deletion in Gliomen (MolPath) als wiederkehrenden Ringversuch angeboten. Im Zeitraum vom 20.06.-01.07.2022 wurde der offene Ringversuch durchgeführt, der von 85 % der Teilnehmer erfolgreich absolviert wurde.

Insgesamt gab es in der Gruppe der Teilnehmer des molekularpathologischen Ringversuches ein sehr hohes Maß an Konkordanz in der Unterscheidung zwischen homozygoten Deletionen und Retentionen des *CDKN2A/B*-Lokus. Heterozygote Deletionen (z.B. Fall 8) wurden deutlich seltener beschrieben als in der Gruppe des Parallelringversuches (ISH), was in der Tat den unterschiedlichen Verfahren geschuldet sein kann. Im diagnostischen Kontext ist diese Information aber von untergeordneter Bedeutung, und sie war deshalb auch nicht bestehensrelevant.

Eine entscheidende Erkenntnis, die der Ringversuch zu Tage gefördert hat, ist, dass es in der Fach-Community kein einheitliches Vorgehen bei der Deletionsbestimmung der Loci *CDKN2A* und *CDKN2B* gibt. Bei den Teilnehmern, die Methylierungsarrays für die Analyse verwendet haben, ist unklar, ob hier eine exakte Unterscheidung zwischen *CDKN2A* und *CDKN2B* überhaupt technisch möglich ist. Teilnehmer, die andere molekularpathologische Methoden verwendet haben, sind unterschiedlich vorgegangen: Während einige Institute eine separate Deletionsanalyse für beide Genloci durchführten, bestimmten andere Teilnehmer nur den Deletionsstatus von *CDKN2A*. Von diesen Teilnehmern wurde dann entweder auch nur der *CDKN2A*-Deletionsstatus angegeben (was aber hier leider die Ringversuchanforderungen nicht erfüllte) oder es wurde von der alleinigen *CDKN2A*-Deletionsbestimmung auf den *CDKN2A/B*-Deletionsstatus extrapoliert.

Während die Annahme, dass *CDKN2A* und *CDKN2B* in der weit überwiegenden Mehrzahl der Fälle gemeinsam verloren sind, natürlich berechtigt ist, wurden jedoch auch immer wieder Fälle beschrieben, bei denen eine isolierte *CDKN2A*- bzw. *CDKN2B*-Deletion vorliegt (z.B. Ichimura et al. 2000, *Cancer Research* no. 60: 417–424; Crespo et al. 2012, *PLoS One* no. 9(7): e46088; Ma et al. 2020, *Neuro-Oncology Advances* no. 12: 1–11). Die aktuell gültige Leitlinie (WHO-Klassifikation der ZNS-Tumoren 2021) wiederum schreibt eine Bestimmung des *CDKN2A*- und *CDKN2B*-Deletionsstatus („*CDKN2A* and/or *CDKN2B* homozygous deletion“) vor.

Dies führt zu dem Dilemma, dass eine alleinige *CDKN2A*-Bestimmung momentan nicht leitlinienkonform ist. Die Aufgabe für eine zukünftige Revision der WHO-Klassifikation muss somit sein, abzuwägen, welcher „medical need“ einer getrennten *CDKN2A*- und *CDKN2B*-Bestimmung wirklich besteht, und die Anforderungen dann entsprechend zu spezifizieren.

**Bericht erstellt am: 21.10.2022**

Signaturdatum:

DocuSigned by:  
*Lara Dimitrova*  
0A9F2C0F072E404...

10/21/2022 | 12:47 PM MESZ

Dr. rer. nat. L. Dimitrova  
Projektmanagement

Signaturdatum:

DocuSigned by:  
*Markus J. Riemenschneider*  
834BC6DE6FF042E...

10/24/2022 | 4:39 PM MESZ

Prof. Dr. med. M.J. Riemenschneider  
Verantw. Mitarbeiter Leadpanelinstitut

**Freigabe am: 21.10.2022**

Signaturdatum:

DocuSigned by:  
*Korinna Jöhrens*  
C4448EE87344446...

10/21/2022 | 4:11 PM MESZ

Prof. Dr. med. K. Jöhrens  
Medizinische Beratung

Signaturdatum:

DocuSigned by:  
*Maja Grassow-Narlik*  
1F8C182C8DC147F...

10/21/2022 | 12:56 PM MESZ

Dr. rer. nat. M. Grassow-Narlik  
Qualitätsmanagement