

	Verfahrensanweisung zur Methodvalidierung	Seite 1 von 23
Datum:25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

**Muster
Verfahrensanweisung: VA**

Titel: Validierung / Verifizierung von Methoden in der Virologie

Diese VA gilt ab: 01.10.2017
Diese VA ersetzt die Fassung vom: 01.05.2015
Vorgenommene Änderungen: Verifizierung von geschlossenen NAT-Kartuschen-systemen und von NAT-Multiplex-Systemen

Zielsetzung und Limitierungen: In der vorliegenden Verfahrensanleitung werden die Maßnahmen zur Methodvalidierung / -verifizierung in der Virologie beschrieben. Erfasst werden davon zum einen kommerziell hergestellte In-vitro-Diagnostika (IVD), bei denen im Rahmen der Verifizierung die Richtigkeit und Präzision zu überprüfen sind und zum anderen in-house-hergestellte IVDs. Von der vorliegenden VA nicht erfasst wird die Herstellung der IVD sowie die Maßnahmen zur Qualitätssicherung (im Sinne einer Chargenkontrolle, Haltbarkeit, Lagerungsbedingungen). Hierfür ist eine separate SOP zu erstellen und darauf zu verweisen. Ebenfalls nicht von dieser VA erfasst werden IVDs, die in Anhang 2, Liste A aufgeführt sind, sofern für diese Parameter CE-markierte Produkte zur Verfügung stehen.

Erstellt am	Geprüft und freigegeben am
von	von
M. Kortenbusch, Dr. A. Berger, Prof. Dr. H. Rabenau	

	Verfahrensanweisung zur Methodvalidierung	Seite 2 von 23
Datum:25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

1. Einleitung

In der vorliegenden Verfahrensweisung werden die Maßnahmen beschrieben, die erforderlich sind, um einen Test (Methode), der (die) neu eingeführt werden soll bzw. bei dem (der) ein Wechsel vorgesehen ist, auf seine Leistungsfähigkeit zu überprüfen. Entsprechende analytische Leistungsdaten sind z.B.: Präzision, Richtigkeit, Linearität, Sensitivität (Nachweisgrenze) sowie die Spezifität. Der Umfang der Überprüfung unterscheidet sich je nachdem, welche Anforderungen an die Methode gestellt werden, z.B. ob es sich um eine Neueinführung oder einen Wechsel des Untersuchungsverfahrens handelt und ob ein im Labor selbst entwickeltes („In-house“) bzw. ein von Fachgesellschaften anerkanntes Verfahren bzw. ein handelsübliches, vom Hersteller validiertes Testsystem eingeführt werden soll.

Erst wenn die Methode validiert bzw. verifiziert und vom Laborleiter freigegeben ist, dürfen Patientenergebnisse damit ermittelt und weitergegeben werden. In Einzelfällen kann von den nachfolgend aufgeführten Vorgaben abgewichen werden, wenn diese Vorgehensweise extrem unwirtschaftlich ist, extrem geringe Probenfrequenzen vorhanden sind oder sie aufgrund eines Mangels an Kontrollen nicht durchführbar ist. Der Laborleiter legt dann (ggf. zusammen mit der leitenden TA) das geänderte Verfahren fest und begründet dies schriftlich.

2. Verantwortlichkeiten

Der Laborleiter ist dafür verantwortlich, dass nur validierte / verifizierte Methoden für die Untersuchungsdurchführung verwendet werden. Er legt Art und Umfang der zu überprüfenden Leistungsdaten fest und entscheidet, ob mit den ermittelten Ergebnissen die Zuverlässigkeit und Leistungsfähigkeit der Methode in der Weise gewährleistet werden kann, dass valide Analysenergebnisse reproduzierbar erzielt werden können. Nach Prüfung und Bewertung aller Validierungs- / Verifizierungsergebnisse erfolgt die Freigabe der Methode in die Routinediagnostik durch den Laborleiter.

3. Verwendete Begriffe und Definitionen:

In Anlehnung an die Definitionen der RiliBÄK gelten folgende Definitionen:

- Richtigkeit:**
- Vergleich der Messwerte mit Referenzwerten
 - Ermittlung und Bewertung der systematischen Messabweichung

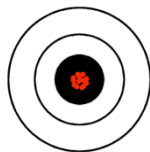
Grad der Übereinstimmung zwischen den in größerer Serie ermittelten Messergebnissen sowie ihres Mittelwertes und einem wahren Wert (anerkannter Referenzwert) (siehe Abb. 1). Sie wird üblicherweise numerisch durch die systematische Messabweichung ausgedrückt, die in umgekehrter Beziehung zur Richtigkeit steht. Die Abweichung des Mittelwertes dieser Messungen vom wahren Wert wird als systematische Messabweichung definiert, ist sie gering, so ist die Richtigkeit hoch. Dies sagt nichts darüber aus, wie stark die einzelnen Werte streuen.

- Präzision:**
- Reproduzierbarkeit
 - Wiederholgenauigkeit eines Labortests
 - Intraassayvarianz
 - Interassayvarianz

	Verfahrensanweisung zur Methodvalidierung	Seite 3 von 23
Datum: 25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

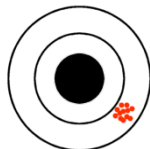
Grad der Übereinstimmung zwischen den einzelnen unabhängigen Messergebnissen (siehe Abb. 1). Das Ausmaß der Präzision wird üblicherweise durch das statistische Maß der „Standardabweichung“ und „relativen Standardabweichung (Variationskoeffizient)“ der Einzelwerte vom Mittelwert angegeben, das in umgekehrter Beziehung zur Präzision steht. Die „Präzision“ eines gegebenen Analysenverfahrens wird entsprechend den aufgeführten Präzisionsbedingungen unterteilt. Die „**Wiederholgenauigkeit**“ bezieht sich auf im Wesentlichen unveränderte Bedingungen und wird oft als „**Präzision in der Serie**“ (**Intraassay**) bezeichnet. Die „**Präzision von Analysenserie zu Analysenserie**“ (**Interassay**) spiegelt die Variationen eines oder mehrerer der Faktoren wider, die innerhalb eines Laboratoriums auftreten: solche Faktoren sind Zeit, Kalibrierung, Untersucher oder Messgerät. Als Maß zur Ermittlung und Bewertung der zufälligen Messabweichung (Beurteilung der Präzision) wird die Standardabweichung bzw. die relative Standardabweichung (**Variationskoeffizient - VK**) berechnet.

Abb. 1: Präzision und Richtigkeit: Im allgemeinen Sprachgebrauch werden oft Ausdrücke wie "genau", "richtig" oder "präzise" vermischt. Die folgenden Abbildungen machen die Unterschiede an Hand der Treffgenauigkeit eines Schützen deutlich.



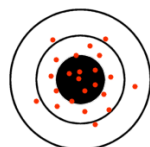
Präzise und richtig

Der Schütze schießt präzise (immer etwa an die gleiche Stelle) und richtig (ins Schwarze)



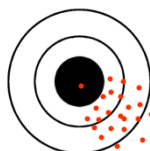
Präzise aber unrichtig

Dieser Schütze schießt auch präzise (immer etwa an die gleiche Stelle) aber unrichtig (immer rechts unten daneben)



Richtig aber unpräzise

Dieser Schütze schießt zwar richtig (die Treffer streuen um das Schwarze) aber unpräzise (die Treffer streuen deutlich)



Unrichtig und unpräzise

Dieser Schütze schießt sowohl unrichtig (die Treffer liegen unter und neben Schwarzen) als auch unpräzise (die Treffer streuen deutlich)

aus: http://www.med4you.at/laborbefunde/allgemeines/lbef_qualitaet.htm#Pr

	Verfahrensanweisung zur Methodvalidierung	Seite 4 von 23
Datum: 25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

Sensitivität: - Rate der echt positiven Ergebnisse

Die Sensitivität ist ein Maß für die Anzahl richtig positiver Ergebnisse verglichen mit der Gesamtzahl der positiven Ergebnisse. Sie wird wie folgt ermittelt:

Sensitivität = $a / a + c$ (siehe auch Abb. 2).

Häufig wird unter dem erweiterten Begriff der Sensitivität auch die Bestimmung der Nachweisgrenze eines Analyten (z.B. durch Endpunkttitration) einbezogen. Zur Ermittlung wird hierzu eine Verdünnungsreihe des positiven Kontroll- oder Referenzmaterials in negativem Probenmaterial (Serum, Plasma, Bronchiallavage usw.) durchgeführt. Falls es möglich ist den Wert zu quantifizieren an dem 95% der eingesetzten Proben mit diesem Gehalt des Analyten noch positiv sind, wird dies als Nachweisgrenze bezeichnet. Zum Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse werden bekannt positive Proben getestet.

Spezifität: - Ausschluss falsch positiver Ergebnisse

Die Spezifität ist ein Maß für die Anzahl richtig negativer Ergebnisse verglichen mit der Gesamtzahl der negativen Ergebnisse. Sie wird wie folgt ermittelt:

Spezifität = $d / d + b$ (siehe auch Abb. 2).

Häufig werden hierzu auch potentiell kreuzreaktive Reaktionspartner (Viren der gleichen Familie, Seren mit Rheumafaktoren und / oder Autoantikörpern) und bekannt negative Proben in die Testung einbezogen.

Abb. 2: Sensitivität und Spezifität - die folgende Kreuztabelle und Formeln machen die Unterschiede deutlich.

Sensitivität der Prüfmethode = $a / a + c$

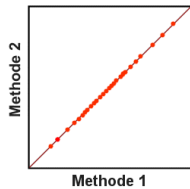
Spezifität der Prüfmethode = $d / d + b$

		Referenzmethode (= „wahr“)	
		pos.	neg.
Prüfmethode	pos.	a	b
	neg.	c	d

Methodenvergleich: Messung der Richtigkeit / Korrelation der (quantitativen) Einzelergebnisse aus zwei verschiedenen Tests zum Nachweis desselben Analyten (klassisches Verfahren ist die Korrelationsanalyse) (siehe Abb. 3).

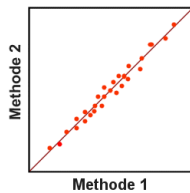
	Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung	Seite 5 von 23
Datum: 25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

Abb. 3: Darstellung der Korrelation beim Vergleich von zwei Methoden



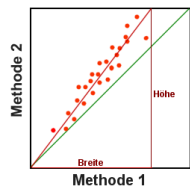
Ideale Korrelation

Die Ergebnisse von Methode 1 und 2 sind identisch und liegen daher alle auf der Identitätsgeraden. Kommt in der Realität praktisch nicht vor. (Ein roter Punkt entsteht, indem man das Ergebnis der Methode 1 auf der X-Achse und das Ergebnis der Methode 2 auf der Y-Achse aufträgt.)



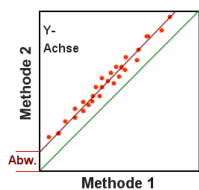
Gute Korrelation

Die Ergebnisse liegen nahe um die und parallel zur Identitätsgeraden. Als Maßzahl für die Übereinstimmung der Methoden wird oft der **Korrelationskoeffizient r** angegeben. Dieser ist idealerweise 1 und liegt bei Vergleichen von Labormethoden meist über 0.95.



Gute Korrelation, aber Methode 2 proportional zu hoch (abweichende Regression)

Die Werte der Methode 2 liegen über der Identitätsgeraden und zwar bei niedrigen Werten kaum, bei hohen deutlich. Die Abweichung ist also proportional zum Wert. Die proportionale Abweichung wird folgendermaßen ermittelt: Man legt (berechnet) eine Gerade (Regressionsgerade) durch die roten Punkte und misst die Steilheit der Geraden (= Regressionskoeffizient oder engl. Slope; wird berechnet als Höhe durch Breite). Im Idealfall ist der Anstieg 1, im vorliegenden Beispiel ist er größer als 1.



Gute Korrelation, aber Methode 2 um einen konstanten Wert zu hoch (parallel versetzte Regression)

Die Werte der Methode 2 liegen über der Identitätsgeraden und zwar bei niedrigen Werten genauso stark wie bei hohen. Die Abweichung ist also nicht proportional zum Wert.

Die nicht proportionale Abweichung wird folgendermaßen ermittelt: Man legt (berechnet) eine Gerade (Regressionsgerade) durch die roten Punkte und misst in welcher Höhe diese Gerade die Y-Achse schneidet (Abw.). Diese Höhe entspricht der konstanten Abweichung. Im Englischen wird dieser Wert y-Intercept genannt.

Linearität:

Bestimmung des linearen **Messbereichs** des Tests.

Biologische bzw. biochemische Reaktionen in der Laboratoriumsmedizin haben oft die Form einer S-Kurve mit 3 Bereichen: 1. exponentieller Anstieg, 2. linearer Bereich, 3. Sättigung.

Neben aufwendigen „curve-modelling-Verfahren“ wird i.d.R. die Regressionsgerade für den linearen Abschnitt berechnet und die davon abweichenden Kurvenverläufe als Endpunkte angegeben. Das sich ergebende b (b = Regressionskoeffizient = Steigung der Kurve) ist beim Faktor 1 optimal - Werte zwischen 0,999 und 0,95 (PCR 0,90) sind zulässig.

	Verfahrensanleitung zur Methodenvvalidierung	Seite 6 von 23
Datum:25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

Funktionen und Formeln zur Berechnung der Übereinstimmung von Methoden:

- **Korrelationskoeffizient (r):** Bestimmt den Grad des Zusammenhanges der Stichproben im Idealfall = 1.
Die Berechnung von r erfolgt durch: $r = \sqrt{b_{yx} \times b_{xy}}$
- **Bestimmtheitsmaß ($r^2 = B$):** Zeigt das Verhältnis des Anteils der Streuung der Punkte der Regressionsgeraden zur Gesamtstreuung und kann daher als Maß der Schärfe mit der die Gerade bestimmt ist und damit als Maß für die Abhängigkeit der beiden Messreihen benutzt werden. Im Idealfall beträgt B = 1.
- **Blandt-Altman`s Methodenvergleich:**
Statistische Methode, um zwei Messverfahren miteinander zu vergleichen. Mittels dieser Methode werden die Differenzen der Wertepaare zwischen zwei Verfahren gegen die Mittelwerte der beiden Messverfahren graphisch dargestellt.
- **Laborvergleich:** Messung der Richtigkeit / Korrelation zweier verschiedener oder gleicher Tests zum Nachweis desselben Analyten in zwei verschiedenen Laboratorien (z.B. durch Nachweis bekannter Analytkonzentrationen in **Ringversuchsproben** oder Referenzmaterial).

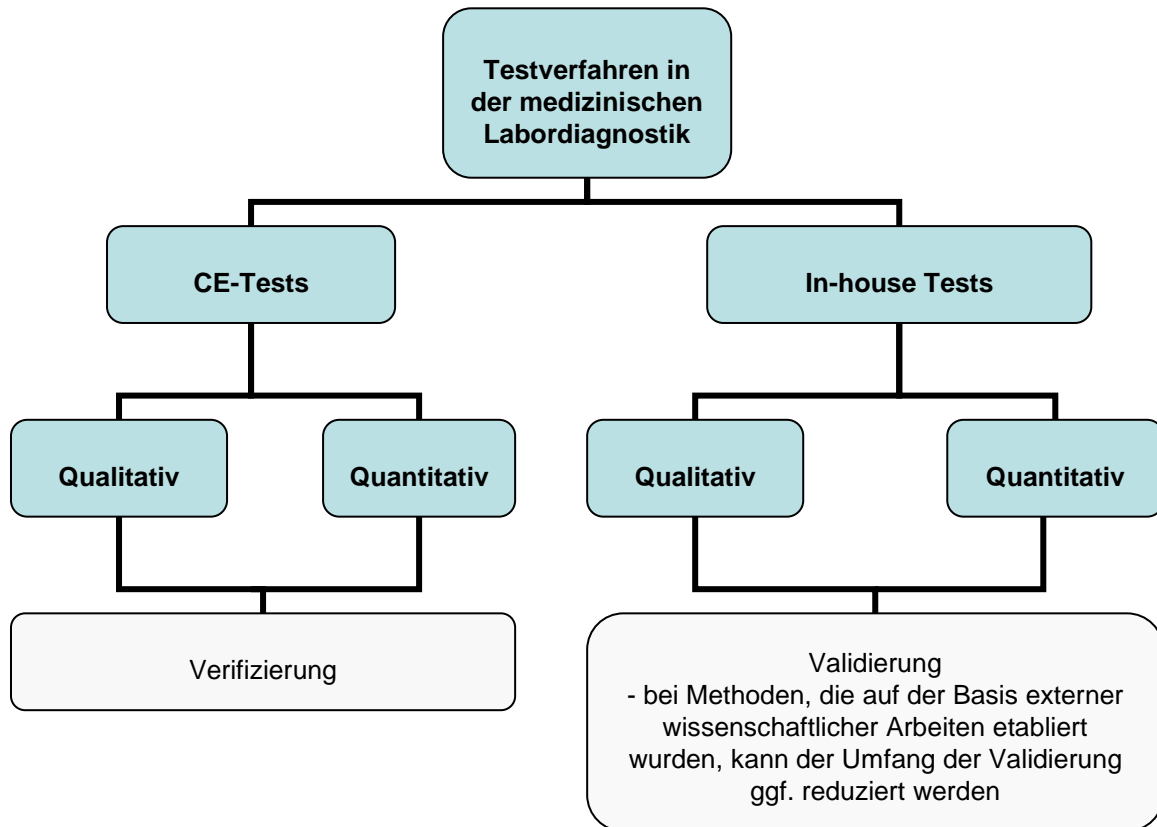
Definition und Einteilung der Testverfahren:

In der Routinediagnostik wird bezüglich der Validierung / Verifizierung von Test wie folgt differenziert (siehe Abb. 4):

- „**CE-Tests**“: Bei „CE“-gekennzeichneten Testsystemen handelt es sich um Tests, die an anderer Stelle entwickelt oder als kommerzieller Reagenzienkit mit CE- Kennzeichnung vertrieben werden. Die Validierung der Methode wurde vom Hersteller durchgeführt und die wesentlichen Validierungsdaten der Methode liegen vor. Der Anwender muss lediglich eine „*Verifizierung*“ vornehmen (siehe Abb. 4).
- „**In-house Test**“: Bei „In-house Tests“ handelt es sich um Methoden, die vom Labor selbst entwickelt wurden oder auf der Basis externer wissenschaftlicher Arbeiten etabliert sind. Das Labor ist in diesem Fall für den Nachweis der Eignung der Methode in der entsprechenden Anwendung verantwortlich („*Validierung*“). Bei Methoden, die auf der Basis externer wissenschaftlicher Arbeiten etabliert wurden, kann der Umfang der Validierung ggf. reduziert werden (siehe Abb. 4).

	Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung	Seite 7 von 23
Datum:25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

Abb. 4: Einteilung der Methoden in der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik bezüglich der Erfordernisse an Methoden-Validierungen / Verifizierung



4. Allgemeine Anmerkungen

Zur Überprüfung von „**CE-Tests**“ vor Einsatz in die Routine ist es ausreichend eine **Verifizierung** von Seiten des Anwenders durchzuführen. Hiermit soll sichergestellt werden, dass die Methode vom Anwender beherrscht wird. Folgende Leistungsdaten sind zu überprüfen:

- Richtigkeit und
- Präzision (Intraassay und Interassay)

Wird in einzelnen Punkten der Methodendurchführung von der Anleitung des Herstellers abgewichen, so ist dies im Verifizierungsbericht aufzuführen, die Auswirkung dieser Abweichung zu erörtern und durch die Änderung ggf. beeinflusste Leistungsdaten sind erneut zu ermitteln und zu validieren.

	Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung	Seite 8 von 23
Datum:25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

Im Rahmen der Validierung von „In-house Tests“ ist ein ausführlicher Validierungsplan, der das Vorgehen sowie die Akzeptanzkriterien beschreibt, zu erstellen. Zu überprüfen sind:

- Präzision (Intraassay und Interassay)
- Richtigkeit
- Linearität (quantitative Testsysteme) bzw. die Nachweisgrenze (qualitative Tests)
- Spezifität
- Sensitivität

Bei der Bestimmung der Reproduzierbarkeit von „negativen“ Proben ist eine statistische Auswertung der „negativen“ absoluten Messwerte (z.B. S/CO-Werte) nicht sinnvoll – es ist lediglich das qualitative Ergebnis und die Wiederholgenauigkeit zu beurteilen.

Gleichzeitig ist es empfehlenswert bei allen Tests im Rahmen der Routineanwendung, quantitativ definierte (soweit möglich und sinnvoll) interne Run Controls (IRC) mitzuführen, um die *Robustheit* des Verfahrens und die *Reproduzierbarkeit* von Messergebnissen zu überwachen. Solche Testkit-unabhängigen IRC sind insbesondere bei Chargenwechseln sinnvoll und erforderlich. Als IRC können sowohl Referenzmaterial als auch andere Proben mit definierten Sollwerten oder Sollwertbereichen fungieren.

Eine orientierende Zusammenfassung der jeweiligen Anforderungen ist in den Tabellen 1-3 aufgeführt.

Bei auftretenden Mängeln bezüglich der validierten / verifizierten Parameter muss der Laborleiter entscheiden, ob die Erprobung abgebrochen oder nach methodischen Verbesserungen erneut gestartet oder nach (begründeter) Erweiterung der Grenzen fortgesetzt werden soll.

Sowohl für „CE-Tests“ als auch für „In-house-Tests“ gilt, dass im Falle der Abweichung von den Vorgaben dieser VA bei der Validierung / Verifizierung dies stets zu begründen ist. Der Laborleiter legt dann das Verfahren fest und begründet dies schriftlich anhand verfügbarer Literatur oder offensichtlicher / logischer Schlussfolgerungen.

Entsprechende Gründe für eine solche Abweichung können u.a. sein:

- Kontrollproben nur schwer erhältlich (z.B. anti-HDV-IgM),
- begrenzte Bedeutung des Parameters (Umfang der Prüfung daher wirtschaftlich nicht vertretbar),
- Methodenwechsel: Wurde der Parameter vorher bereits mit einer anderen Methode oder Test durchgeführt, ist dem direkten Vergleich der Tests durch Paralleltestung von Patientenproben der Vorrang zu geben. In diesem Fall kann ein eingeschränkter Validierungsumfang definiert werden.

Ferner gilt sowohl für „CE-Tests“ als auch für „In-house-Tests“, dass bei serologischen und Zellkultur-basierten Testsystemen grundsätzlich alle (quantitativen) Ergebnisse, die im Rahmen der Methodenvvalidierung / -verifizierung ermittelt werden, die **Interassay-Präzision einen VK von $\leq 50\%$ aufweisen und die Intraassay-Präzision von 15-30% nicht überschreiten sollte.**

Bei semiquantitativen und qualitativen „CE-Tests“, bei denen ein Ergebnis innerhalb bestimmter Werteklassen ermittelt wird (z.B. Titerstufen, negativ / positiv), sollten bei rein qualitativen Tests die Ergebnisse im Regelfall deckungsgleich sein, während bei semiquantitativen Tests, deren Werte als „Titer“ angegeben werden, Abweichungen von \pm einer Titerstufe akzeptiert werden können. Bei Diskrepanzen sind diese durch den Laborleiter zu bewerten.

	Verfahrensanleitung zur Methodenvvalidierung	Seite 9 von 23
Datum: 25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

Sofern vorhanden und möglich, sollten bei quantitativen IVDs internationale Standards und / oder Referenzmaterialien mitgeführt werden.

Bei (semi)quantitativen molekularbiologischen Testsystemen sollte die Interassay-Präzision $\pm 1 \log_{10}$ (oder 3,3 CT/CP/CQ) und die Intraassay-Präzision $\pm 0,8 \log_{10}$ nicht überschreiten.

Besteht die Möglichkeit während der Überprüfungsphase mit der einzuführenden Methode an einem Ringversuch teilzunehmen, so sollte auch dieses Ergebnis zur Bewertung der Richtigkeit in den Validierungsbericht einfließen.

Für **Methodenwechsel** bei **semiquantitativen und qualitativen Tests** gilt:

Wurde der zu untersuchende Parameter bisher schon mit einer anderen Methode bestimmt, ist – zusätzlich zu den unter Pkt. 5 – 7 aufgeführten Anforderungen - ein *Testvergleich* durchzuführen. Dazu wird eine statistisch angemessene Anzahl von Patientenproben (i.d.R. ca. 20; bei qualitativen geschlossenen, mechanisierten molekulargenetischen Testsystemen (z.B. Unit-Use Testkartuschen) zum Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäure i.d.R. 5 Proben) parallel mit der neuen und alten Methode gemessen und die (semiquantitativen) Ergebnisse gegenübergestellt. Dazu bietet sich bei Untersuchungen mit zwei oder mehr Ergebnisstufen der Vergleich der beiden Methoden durch Darstellung in einem Vielfelder-Test an.

Sind viele Ergebnisstufen möglich, wie z. B. bei Titern, ist eine Beschränkung auf den wesentlichen Bereich sinnvoll. Die waagerechte Richtung gibt dabei die Ergebnisstufen der bisherigen Methode, die senkrechte die der zu prüfenden Methode an. Die Ergebnispaare werden als Strichliste den entsprechenden Unterquadraten zugeordnet und gezählt. Bei der Auswahl der Patientenproben sollte darauf geachtet werden, dass diese schwach positive, stark positive, negative und grenzwertige (Vor)Resultate aufweisen.

Für **Methodenwechsel** bei **quantitativen Tests** gilt:

Wurde der zu untersuchende Parameter bisher schon mit einer anderen Methode bestimmt, ist – zusätzlich zu den unter Pkt. 5 – 7 aufgeführten Anforderungen - ein *Testvergleich* durchzuführen. Dazu wird eine statistisch angemessene Anzahl von Patientenproben (i.d.R. ca. 20; bei quantitativen geschlossenen, mechanisierten molekulargenetischen Testsystemen (z.B. Unit-Use Testkartuschen) zum Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäure i.d.R. 5 Proben) parallel mit der neuen und alten Methode gemessen und die Ergebnisse gegenübergestellt. Dazu bietet es sich an den Vergleich der beiden Methoden mit Hilfe der Regressionsanalyse auszuwerten.

Bei der Auswahl der Patientenproben sollte darauf geachtet werden, dass diese den Entscheidungsbereich aber auch den oberen und unteren Messbereich abdecken. Berechnet wird der Korrelationskoeffizient (vom Wertebereich abhängig), die Standardabweichung und ggf. zusätzlich die Differenzen der Wertepaare, deren Mittelwert und Standardabweichung. Ergänzend erfolgt eine graphische Darstellung der Regressionsgeraden.

Im Folgenden werden die Validierungs- / Verifizierungskriterien für die Bereiche Infektionsserologie (einschließlich Antigennachweise) (Pkt. 5), Virusisolierung (Pkt. 6) und molekularbiologische Virusdiagnostik (Pkt. 7) getrennt voneinander aufgeführt. Zusätzlich wird dabei – soweit sinnvoll – unterschieden nach „CE-Tests“ und „In-house-Tests“.

	Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung	Seite 10 von 23
Datum:25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

5. Tests in der Infektionsserologie

5.1. „CE-Tests“ in der Infektionsserologie

„CE-Tests“: Semiquantitative und qualitative Methoden

Bei semiquantitativen und qualitativen „CE-Tests“ wird ein Ergebnis innerhalb bestimmter Werteklassen ermittelt (z.B. Titerstufen, negativ / positiv). Hier wird die Methode folgendermaßen überprüft:

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit:

Intraassay-Präzision: mindestens je ein bekannt positives, ein bekannt negatives und ein schwach positives / grenzwertiges Material wird am ersten Tag in Dreifachbestimmung untersucht. Die Matrix dieser Kontrollen sollte dabei dem Patientenmaterial entsprechen.

Interassay-Präzision: die gleichen Proben werden an zwei weiteren Tagen in Einfachbestimmung untersucht. Anschließend sind die Abweichungen innerhalb der Serien und von Tag zu Tag zu beurteilen und die Ergebnisse bezüglich *Richtigkeit* und Präzision zu vergleichen.

„CE-Tests“: Quantitative Methoden in der Infektionsserologie

Bei quantitativen „CE-Tests“ wird die Methode folgendermaßen überprüft:

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit:

Intraassay-Präzision: mindestens 10 verschiedene Proben (Referenzmaterial, Patientenproben oder Poolserum), d.h. 3 negative, 3 schwach, 3 höher und 1 stark positive Probe(n) sind am ersten Tag in Dreifachbestimmung zu untersuchen. Die Matrix dieser Kontrollen sollte dabei dem Patientenmaterial entsprechen.

Interassay-Präzision: je eine der am ersten Tag getesteten Proben aus den unterschiedlichen Bereichen wird an zwei weiteren Tagen in Einfachbestimmung untersucht.

Anschließend sind die Abweichungen innerhalb der Serien und von Tag zu Tag zu beurteilen und die Ergebnisse bezüglich *Richtigkeit* und Präzision zu vergleichen. Darüber hinaus sollten, je nach Bedeutung für die Analytik, ggf. weitere vom Hersteller ermittelte Leistungsdaten (z.B. Linearität) überprüft werden.

5.2 „In-house Tests“

„In-house Tests“: Qualitative Methoden in der Infektionsserologie

Die im Folgenden beschriebenen Maßnahmen zur Methodenvvalidierung gelten für selbstentwickelte semiquantitative und qualitative Methoden und Tests. Hier wird die Methode folgendermaßen überprüft:

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit:

Intraassay-Präzision: mindestens je ein bekannt positives, ein bekannt negatives und ein schwach positives / grenzwertiges Material wird am ersten Tag in Dreifachbestimmung untersucht. Die Matrix dieser Kontrollen sollte dabei dem Patientenmaterial entsprechen.

Interassay-Präzision: die gleichen Proben werden an zwei weiteren Tagen in Einfachbestimmung untersucht.

	Verfahrensanweisung zur Methodvalidierung	Seite 11 von 23
Datum:25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

Sensitivität : Testung von mindestens 10 bekannt positiven und mindestens 10 bekannt schwach positiven bzw. grenzwertigen Proben

Spezifität:
- Testung von mindestens 20 bekannt negativen Proben
- Testung von potentiell kreuzreaktiven Analyten (Seren, die Antikörper gegen andere Viren derselben Familie aufweisen, Rheumafaktor (Gewebsautoantikörper) positive Seren, Seren mit anderen Autoantikörpern – für Antigenteste gilt: Proben mit Viren derselben Familie): je Analyt möglichst mindestens 3 Proben. Es ist darauf zu achten, dass bei der Prüfung Proben eingesetzt werden, die für den potentiell kreuzreaktiven Parameter stark bzw. hoch positiv sind.

Anschließend sind die Abweichungen innerhalb der Serien und von Tag zu Tag zu beurteilen und die Ergebnisse bezüglich *Richtigkeit* und Präzision zu vergleichen. Darüber hinaus sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität zu bewerten.

„In-house Tests“: Quantitative Analysenmethoden in der Infektionsserologie

Bei quantitativen „in house“-Tests wird die Methode folgendermaßen überprüft:

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit:

Intraassay-Präzision: mindestens 12 verschiedene Proben (Referenzmaterial, Patientenproben oder Poolserum), d.h. 3 negative, 3 schwach positive, 3 höher und 3 stark positive Proben sind am ersten Tag in Dreifachbestimmung zu untersuchen. Die Matrix dieser Kontrollen sollte dabei dem Patientenmaterial entsprechen.

Interassay-Präzision: je eine der am ersten Tag getesteten Proben aus den vier unterschiedlichen Messbereichen werden an zwei weiteren Tagen in Einfachbestimmung untersucht.

Sensitivität : Testung von mindestens 10 bekannt positiven und mindestens 10 bekannt schwach positiven bzw. grenzwertigen Proben

Spezifität:
- Testung von mindestens 20 bekannt negativen Proben
- Testung von potentiell kreuzreaktiven Analyten (Seren, die Antikörper gegen andere Viren derselben Familie aufweisen, Rheumafaktor (Gewebsautoantikörper) positive Seren, Seren mit anderen Autoantikörpern – für Antigenteste gilt: Proben mit Viren derselben Familie): je Analyt möglichst mindestens 3 Proben. Es ist darauf zu achten, dass bei der Prüfung Proben eingesetzt werden, die für den potentiell kreuzreaktiven Parameter stark bzw. hoch positiv sind.

Linearität: mindestens 2 Proben (positives Kontrollmaterial) werden in einer (1:10-er oder 1:5-er) Verdünnungsreihe (mit mindestens 4 Verdünnungsstufen) getestet. Der Test ist mindestens im Doppelansatz durchzuführen.

Anschließend sind die Abweichungen innerhalb der Serien und von Tag zu Tag zu beurteilen und die Ergebnisse bezüglich *Richtigkeit* und Präzision zu vergleichen. Darüber hinaus sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Sensitivität, Spezifität und Linearität zu bewerten.

	Verfahrensanweisung zur Methodvalidierung	Seite 12 von 23
Datum: 25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

6. Tests in der Virusisolierung

6.1. „In-house Tests“: Qualitative und semiquantitative Methoden in der Virusisolierung

Für die Validierung in der Virusisolierung gilt:

Bei der Virusisolierung ist vor allem die Eignung der Zellen für entsprechende Viren zu testen. Neue Zelllinien werden nur dann in die Routine eingeführt, wenn folgende Parameter überprüft wurden:

Suszeptibilität: Dabei wird an 3 Tagen im Dreifachansatz die zu validierende Zelle mit dem jeweiligen Referenzstamm und zusätzlich – sofern vorhanden – zwei Patientenisolaten infiziert. Dabei sollte, wenn möglich, das Virus titriert sein und mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 0,01 – 0,1 gearbeitet werden. Im Rahmen der Suszeptibilitätsprüfung der Zellen sollte auch ein *Methodenvergleich* durchgeführt werden. Dabei werden in der laufenden Routine die zu validierenden Zelllinien neben den „Routinezellen“ parallel mit den Patientenproben beimpft und täglich auf zytopathogene Veränderungen untersucht.

zytotoxische Effekte von Stoffen oder Probenmaterial auf die Zellkultur

(Matrixeffekte): Die Abklärung erfolgt im Rahmen des Methodenvergleichs und Protokollierung der Zellviabilität. Der Umfang der Prüfung darf 20 (verschiedene) (Patienten)Proben nicht überschreiten.

Anschließend sind die Abweichungen zu beurteilen und die Ergebnisse bezüglich *Richtigkeit* zu vergleichen. Bei auftretenden Differenzen muss der Laborleiter entscheiden, ob:

- bei den getesteten Referenzstämmen bzw. Patientenisolaten eine Verbesserung aufgetreten ist
- die Erprobung abgebrochen wird
- nach methodischen Verbesserungen die Testung / Validierung erneut gestartet oder nach (begründeter) Erweiterung der Grenzen fortgesetzt werden soll.

	Verfahrensanweisung zur Methodvalidierung	Seite 13 von 23
Datum: 25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

7. Tests in der molekularbiologische Virusdiagnostik (NAT)

7.1. „CE-Tests“

„CE-Tests“: Qualitative Methoden in der Molekularbiologie

Bei qualitativen „CE-Tests“ wird eine Probe auf das Vorhandensein viraler Nukleinsäure überprüft (negativ / positiv). Die Methodenverifizierung erfolgt zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit:

Intraassay-Präzision: mindestens je ein bekannt positives, ein bekannt negatives und ein schwach positives (ggf. grenzwertiges) Material werden am ersten Tag in Dreifachbestimmung untersucht. Die Matrix dieser Kontrollen sollte dabei dem Patientenmaterial entsprechen.

Interassay-Präzision: die gleichen Proben werden an zwei weiteren Tagen in Einfachbestimmung untersucht. Anschließend sind die Abweichungen innerhalb der Serien und von Tag zu Tag zu beurteilen und die Ergebnisse bezüglich *Richtigkeit* und Präzision zu vergleichen.

„CE-Tests“: Quantitative Methoden in der Molekularbiologie

Bei quantitativen „CE-Tests“ wird die Methode folgendermaßen überprüft:

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit:

Intraassay-Präzision: mindestens 9 verschiedene Proben (Referenzmaterial, Patientenproben oder Poolserum), d.h. 3 negative, 3 schwach und 3 höher positive Proben sind am ersten Tag in Dreifachbestimmung zu untersuchen. Die Matrix dieser Kontrollen sollte dabei dem Patientenmaterial entsprechen.

Interassay-Präzision: je eine der am ersten Tag getesteten Proben aus den unterschiedlichen Bereichen werden an zwei weiteren Tagen in Einfachbestimmung untersucht.

Linearität: eine Probe (positives Kontrollmaterial) wird in einer (1:10-er) Verdünnungsreihe (mit mindestens 3 Verdünnungsstufen) getestet. Der Test ist mindestens im Doppelansatz durchzuführen.

Anschließend sind die Abweichungen innerhalb der Serien und von Tag zu Tag zu beurteilen und die Ergebnisse bezüglich *Richtigkeit* und Präzision zu vergleichen. Darüber hinaus sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Linearität zu bewerten.

„CE-Tests“: geschlossene, mechanisierte molekulargenetische Testsysteme (z.B. Unit-Use Testkartuschen) zum qualitativen / quantitativen Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäure

Die im Folgenden beschriebenen Maßnahmen zur Methodenverifizierung gelten für geschlossene, mechanisierte molekulargenetische Testsysteme (z.B. Unit-Use Testkartuschen¹) zum qualitativen /

¹exemplarisch seien als Test-/Methoden-Machart das Cepheid Xpert und analog arbeitende Systeme genannt

	Verfahrensanleitung zur Methodenvvalidierung	Seite 14 von 23
Datum: 25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

quantitativen Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäure. Grundsätzlich ist darauf zu achten, dass bei diesen Systemen ausreichende Verfahrenskontrollen (z.B. Extraktions- / Aufreinigungs- sowie Inhibitionskontrollen) integriert sind. Werden z.B. bei einem Unit-Use-Testkartuschen-System nicht nur ein, sondern zwei oder drei Analyte gleichzeitig detektiert (z.B. Influenza A, Influenza B und RSV) kann auf Grund der „geschlossenen“ Struktur des Testsystems (und der damit verbundenen geringeren, externen Einflussmöglichkeiten auf das Testergebnis sowie des Umstandes, dass der Einsatz jeder Testkartusche einen separaten Testansatz darstellt), die Intraassay-Verifizierung entfallen und die Verifizierung exemplarisch mit nur einem der Analyte durchgeführt werden. Die Funktionalität der übrigen detektierbaren Analyte wird im Rahmen der routinemäßig mitgeführten internen und externen Qualitätskontrollen überprüft und dokumentiert. Sind im Analysengerät mehrere Testplätze vorhanden (Multimodul-Gerät), ist sicherzustellen, dass bei der Austestung verschiedene Testplätze (Module) verwendet werden, soweit nicht durch das Gerät vorgegeben. Die Methodenverifizierung erfolgt zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit.

Prinzipiell sind auch die Anforderungen zur spezifischen Präanalytik zu beachten. So ist zu unterscheiden, ob diese bereits abgefüllte und mitgelieferte Puffer und „Einmalpipetten“ umfasst (um auf diese Weise das Risiko des Eintrages von Kontaminationen - z.B. durch eigene Pipetten oder Puffer - zu reduzieren) oder Labor-eigene Reagenzien (z.B. Hinzufügen von eigenen Puffern) in das Untersuchungsmaterial bzw. das Reaktionssystem eingebracht werden oder Systeme vorliegen, bei denen einzelne Komponenten (z.B. Extraktionspuffer, Lyse- / Protease-Reagenz, Master-Mix, Primer, Sonden) separat vermischt / pipettiert werden. Bei Veränderungen der Präanalytik (z.B. andere Materialien, selbstangesetzte Puffer) ist der Umfang der Verifizierung vom Laborleiter festzulegen.

Bei qualitativen „CE-Kartuschen-Tests“ wird eine Probe auf das Vorhandensein viraler Nukleinsäure überprüft (negativ / positiv):

Interassay-Präzision: mindestens je ein bekannt positives, ein bekannt negatives und ein schwach positives Material werden an drei verschiedenen Tagen in Einfachbestimmung untersucht. Die Matrix dieser Kontrollen sollte dabei dem Patientenmaterial entsprechen.

Anschließend sind die Abweichungen von Tag zu Tag zu beurteilen und die Ergebnisse bezüglich *Richtigkeit* und Präzision zu vergleichen.

Bei quantitativen „CE-Kartuschen-Tests“ wird die Methode folgendermaßen überprüft:

Interassay-Präzision: mindestens 5 Proben (davon sollten mindestens drei von verschiedenen Patienten bzw. unterschiedlichen Ursprungs sein [Referenzmaterial, Patientenproben oder Poolserum]), d.h. 1 negative, 2 schwach und 2 höher positive Proben werden an drei verschiedenen Tagen in Einfachbestimmung untersucht. Die Matrix dieser Kontrollen sollte dabei dem Patientenmaterial entsprechen.

Linearität: eine Probe (positives Kontrollmaterial) wird in einer (1:10-er) Verdünnungsreihe (mit mindestens 3 Verdünnungsstufen) getestet. Der Test ist mindestens in Einfachbestimmung durchzuführen. Die Testung kann ggf. mit der Interassay-Prüfung und den dabei verwendeten Proben „kombiniert“ werden.

Anschließend sind die Abweichungen innerhalb der Serien und von Tag zu Tag zu beurteilen und die Ergebnisse bezüglich *Richtigkeit* und Präzision zu vergleichen. Darüber hinaus sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Linearität zu bewerten.

	Verfahrensanleitung zur Methodenvvalidierung	Seite 15 von 23
Datum:25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

„CE-Tests“: geschlossene, mechanisierte molekulargenetische Multiplex-Testsysteme (z.B. Unit-Use Testkartuschen)

Die im Folgenden beschriebenen Maßnahmen zur Methodenverifizierung gelten für geschlossene, mechanisierte molekulargenetische Multiplex-Testsysteme (z.B. Unit-Use Testkartuschen² zum qualitativen Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäure, wobei mit einer Testkartusche oftmals deutlich mehr als 10 verschiedene Erreger (z.B. Viren, Bakterien) bzw. (Sub-)Typen der Erreger detektiert werden können).

Grundsätzlich ist darauf zu achten, dass bei diesen Systemen ausreichende Verfahrenskontrollen (z.B. Extraktions- / Aufreinigungs- sowie Inhibitionskontrollen) integriert sind. Auf Grund der „geschlossenen“ Struktur des Testsystems (und der damit verbundenen geringeren, externen Einflussmöglichkeiten auf das Testergebnis sowie des Umstandes, dass der Einsatz jeder Testkartusche einen separaten Testansatz darstellt), kann die Intraassay-Verifizierung entfallen und die Verifizierung exemplarisch mit nur einem der Analyte durchgeführt werden. Die Funktionalität der übrigen detektierbaren Analyte wird im Rahmen der routinemäßig mitgeführten internen und externen Qualitätskontrollen überprüft und dokumentiert. Sind im Analysengerät mehrere Testplätze vorhanden (Multimodul-Gerät), ist sicherzustellen, dass bei der Austestung verschiedene Testplätze (Module) verwendet werden, soweit nicht durch das Gerät vorgegeben.

Die Methodenverifizierung erfolgt zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit. Auf Grund der z.T. erheblichen Kosten pro Testkartusche (diese liegen teilweise zwischen 80 - 180,- € / zum Zeitpunkt der Abfassung dieses Dokuments) ist eine umfängliche Verifizierung aus ökonomischen Gründen oftmals nicht vertretbar. Dennoch ermöglichen diese Systeme wertvolle und schnelle labordiagnostische Aussagen und sollten daher nicht auf Grund des reduzierten Verifizierungsumfanges aus dem Scope möglicher Testsysteme ausgeschlossen werden.

Prinzipiell sind auch die Anforderungen zur spezifischen Präanalytik zu beachten. So ist zu unterscheiden, ob diese bereits abgefüllte und mitgelieferte Puffer und „Einmalpipetten“ umfasst (um auf diese Weise das Risiko des Eintrages von Kontaminationen - z.B. durch eigene Pipetten oder Puffer - zu reduzieren) oder Labor-eigene Reagenzien (z.B. Hinzufügen von eigenen Puffern) in das Untersuchungsmaterial bzw. das Reaktionssystem eingebracht werden oder Systeme vorliegen, bei denen einzelne Komponenten (z.B. Extraktionspuffer, Lyse- / Protease-Reagenz, Master-Mix, Primer, Sonden) separat vermischt / pipettiert werden. Bei Veränderungen der Präanalytik (z.B. andere Materialien, selbstangesetzte Puffer) ist der Umfang der Verifizierung vom Laborleiter festzulegen.

Bei qualitativen „CE-„Multiplex-Kartuschen-Tests“ wird eine Probe auf das Vorhandensein verschiedener viraler und / oder bakterieller Nukleinsäure überprüft (negativ / positiv):

Interassay-Präzision: mindestens je ein bekannt positives und ein bekannt negatives Material werden an zwei verschiedenen Tagen in Einfachbestimmung untersucht. Die Matrix dieser Kontrollen sollte dabei dem Patientenmaterial entsprechen.

Anschließend sind die Abweichungen von Tag zu Tag zu beurteilen und die Ergebnisse bezüglich *Richtigkeit* und *Präzision* zu vergleichen.

²exemplarisch seien als Test-/Methoden-Machart das bioMerieux Film Array und analog arbeitende Systeme genannt

	Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung	Seite 16 von 23
Datum:25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

„CE-Tests“: nicht-vollständig-geschlossene / „offene“ molekulargenetische Multiplex-Testsysteme

Die im Folgenden beschriebenen Maßnahmen zur Methodenverifizierung gelten für nicht-vollständig-geschlossene / „offene“ molekulargenetische Multiplex-Testsysteme³ zum qualitativen / (semi)quantitativen Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäure, wobei mit einem Testansatz oftmals deutlich mehr als 10 verschiedene Erreger (z.B. Viren, Bakterien) bzw. (Sub-)Typen der Erreger detektiert werden können.

Grundsätzlich ist darauf zu achten, dass bei diesen Systemen ausreichende Verfahrenskontrollen (z.B. Extraktions- / Aufreinigungs- sowie Inhibitionskontrollen) integriert sind. Auf Grund der z.T. erheblichen Kosten pro Testansatz ist eine umfängliche Verifizierung aus ökonomischen Gründen oftmals nicht vertretbar. Dennoch ermöglichen diese Systeme wertvolle und schnelle labordiagnostische Aussagen und sollten daher nicht auf Grund des reduzierten Verifizierungsumfangs aus dem Scope möglicher Testsysteme ausgeschlossen werden.

Auf Grund der „nicht-geschlossenen“ Struktur des Testsystems ist eine umfänglichere Testung im Vergleich zu „geschlossenen, mechanisierten Multiplex-Systemen“ erforderlich. Dennoch kann die Intraassay-Verifizierung entfallen und die Verifizierung exemplarisch mit nur drei der Analyte durchgeführt werden. Die Funktionalität der übrigen detektierbaren Analyte wird im Rahmen der routinemäßig mitgeführten internen und externen Qualitätskontrollen überprüft und dokumentiert. Die Methodenverifizierung erfolgt zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit.

Prinzipiell sind auch die Anforderungen zur spezifischen Präanalytik zu beachten. So ist zu unterscheiden, ob diese bereits abgefüllte und mitgelieferte Puffer und „Einmalpipetten“ umfasst (um auf diese Weise das Risiko des Eintrages von Kontaminationen - z.B. durch eigene Pipetten oder Puffer - zu reduzieren) oder Labor-eigene Reagenzien (z.B. Hinzufügen von eigenen Puffern) in das Untersuchungsmaterial bzw. das Reaktionssystem eingebracht werden oder Systeme vorliegen, bei denen einzelne Komponenten (z.B. Extraktionspuffer, Lyse- / Protease-Reagenz, Master-Mix, Primer, Sonden) separat vermischt / pipettiert werden. Bei Veränderungen der Präanalytik (z.B. andere Materialien, selbstangesetzte Puffer) ist der Umfang der Verifizierung vom Laborleiter festzulegen.

Bei qualitativen (bzw. semiquantitativen) nicht-vollständig-geschlossenen / „offenen“ molekulargenetischen Multiplex-Testsystemen wird eine Probe auf das Vorhandensein viraler Nukleinsäure überprüft (negativ / positiv):

Interassay-Präzision: von mindestens drei verschiedenen Analyten sind jeweils mindestens je ein bekannt positives, ein bekannt negatives und ein schwach positives Material an drei verschiedenen Tagen in Einfachbestimmung zu untersuchen. Die Matrix dieser Kontrollen sollte dabei dem Patientenmaterial entsprechen.

Anschließend sind die Abweichungen von Tag zu Tag zu beurteilen und die Ergebnisse bezüglich *Richtigkeit* und Präzision zu vergleichen.

³exemplarisch seien als Test-/Methoden-Machart das Luminex Multiplex Assay und analog arbeitende Systeme genannt

	Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung	Seite 17 von 23
Datum:25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

7.2. „In-house-Tests“

Die im Folgenden beschriebenen Maßnahmen zur Methodenvvalidierung gelten für selbstentwickelte semi-quantitative und qualitative Methoden und Tests. Für die qualitative Durchführung der PCR wird in dem Kontrollmaterial der Nachweis von ca. 10 Genomkopien / Reaktionsansatz (ca. 1.000 Kopien/ml [z.B. Plasma]) einer bestimmten, erregerspezifischen Nukleinsäure angestrebt.

Die praktische Etablierung einer neuen „in-house“ Methode im NAT-Bereich setzt den Abgleich der verwendeten Sequenzen im Virus-Blast und /oder das Zugrundelegen einer Veröffentlichung mit Virusnukleinsäure-Sequenzen voraus. Eine Verifizierung des Amplifikationsproduktes durch Realtime-PCR, Sequenzierung oder andere Verfahren vorzunehmen. Ferner wird das Mitführen einer „Internen Kontrolle“ als Extraktions- und PCR-Kontrolle angestrebt.

Zum Ausschluss, dass unterschiedliches Untersuchungsmaterial (z.B. Urin, Sputum) Einfluss auf die Sensitivität und Spezifität des Tests hat, wird i.d.R. eine (quantifizierte) Inhibitionskontrolle (z.B. murines CMV) mitgeführt. Die CT-Werte sollten zwischen den einzelnen Untersuchungsmaterialien um nicht mehr als ± 3 schwanken. Fehlt eine entsprechende Inhibitionskontrolle ist das jeweilige Untersuchungsmaterial z.B. mit Referenzvirusmaterial zu versetzen (sogenanntes „spiken“), so dass die Endverdünnung in dem aufgestockten Material ca. 1 log-Stufe über der Nachweisgrenze liegt. Das Untersuchungsmaterial wird parallel „ungespikt“ und „gespikt“ in die Methode eingesetzt. Der Testansatz ohne Viruszusatz muss für diesen Virusnachweis negativ, die „gespikte“ Probe positiv werden. Der Nachweis ist in zwei voneinander unabhängigen Ansätzen zu verifizieren. Wird das „gespikte“ Material nicht detektiert, ist der Nachweis aus diesem Material, unter Einhaltung der Nachweisgrenze, nicht möglich.

„In-house-Tests“: Qualitative Analysenmethoden in der Molekularbiologie

Die im Folgenden beschriebenen Maßnahmen zur Methodenvvalidierung gelten für selbstentwickelte semi-quantitative und qualitative Methoden und Tests. Hier wird die Methode folgendermaßen überprüft:

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit:

Intraassay-Präzision: mindestens je ein bekannt positives, ein bekannt negatives und ein schwach positives / grenzwertiges Material wird am ersten Tag in Dreifachbestimmung untersucht. Die Matrix dieser Kontrollen sollte dabei dem Patientenmaterial entsprechen.

Interassay-Präzision: die gleichen Proben werden an zwei weiteren Tagen in Einfachbestimmung untersucht.

Sensitivität: Testung von mindestens 10 bekannt positiven und mindestens 10 bekannt schwach positiven bzw. grenzwertigen Proben.

Ebenfalls zu berücksichtigen und zu überprüfen sind Unterschiede der Empfindlichkeit des Tests bezüglich nahe verwandter Erreger, z.B. beim Typen-unabhängigen Nachweis von HSV-DNA, ob die gleiche Sensitivität gegenüber HSV-1 und HSV-2 besteht.

	Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung	Seite 18 von 23
Datum:25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

Spezifität:

- Testung von mindestens 20 bekannt negativen Proben
- Testung potentiell kreuzreaktiver Analyte (Proben, die für Viren derselben Familie positiv getestet wurden oder mit potentiell kreuzreaktiven Referenzmaterial „gespikt“ wurden). Soweit möglich bzw. verfügbar, sollte je ein potentiell kreuzreaktiver Analyt untersucht werden. Es ist darauf zu achten, dass bei der Prüfung Proben eingesetzt werden, die für den potentiell kreuzreaktiven Parameter stark bzw. hoch positiv sind (i.d.R. mindestens 10^5 TCID₅₀/ml oder 10^5 Kopien/ml).

Linearität: mindestens 2 Proben (positives oder positiv „gespiktes“ Kontrollmaterial) werden in einer (1:10-er) Verdünnungsreihe (mit mindestens 4 Verdünnungsstufen) getestet. Der Test ist an zwei verschiedenen Tagen jeweils mindestens im Doppelansatz durchzuführen.

Matrixeffekt: Testung von verschiedenen, virushaltigen Untersuchungsmaterialien, die zur Durchführung des Parameters als Untersuchungsmaterial sinnvoll erscheinen, durch „Spiken“ mit positivem Kontrollmaterial bzw. durch Abgleich der CT-Werte.

Anschließend sind die Abweichungen innerhalb der Serien und von Tag zu Tag zu beurteilen und die Ergebnisse bezüglich *Richtigkeit* und *Präzision* zu vergleichen. Darüber hinaus sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur *Sensitivität*, *Spezifität* und *Linearität* zu bewerten.

Neben den o.g. Überprüfungen erfolgt i.d.R. eine kontinuierliche Kontrolle der *Robustheit* des Verfahrens und der *Reproduzierbarkeit* von Messergebnissen i.d.R. durch das Mitführen von (quantitativ definierten) internen Run Controls (IRC), die aus Referenzmaterial, soweit verfügbar, hergestellt sind. Die IRC-Daten können zur Bewertung der Richtigkeit in den Validierungsbericht einfließen. Soweit Kontrollpanel verfügbar sind, sollten diese ggf. zusätzlich getestet werden.

„In-house Tests“: Quantitative Analysenmethoden in der Molekularbiologie

Bei quantitativen „in-house“ wird die Methode folgendermaßen überprüft:

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit:

Intraassay-Präzision: mindestens 12 verschiedene Proben (Referenzmaterial, Patientenproben oder Poolserum), d.h. 3 negative, 3 schwach positive, 3 höher und 3 stark positive Proben sind am ersten Tag in Dreifachbestimmung zu untersuchen. Die Matrix dieser Kontrollen sollte dabei dem Patientenmaterial entsprechen.

Interassay-Präzision: je eine der am ersten Tag getesteten Proben aus den vier unterschiedlichen Messbereichen werden an zwei weiteren Tagen in Einfachbestimmung untersucht.

Sensitivität: Testung von mindestens 10 bekannt positiven und mindestens 10 bekannt schwach positiven bzw. grenzwertigen Proben.

Ebenfalls zu berücksichtigen und zu überprüfen sind Unterschiede der Empfindlichkeit des Tests bezüglich nahe verwandter Erreger, z.B. beim Typen-unabhängigen Nachweis von HSV-DNA, ob die gleiche Sensitivität gegenüber HSV-1 und HSV-2 besteht.

	Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung	Seite 19 von 23
Datum: 25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

Spezifität:

- Testung von mindestens 20 bekannt negativen Proben
- Testung potentiell kreuzreaktiver Analyte (Proben, die für Viren derselben Familie positiv getestet wurden oder mit potentiell kreuzreaktiven Referenzmaterial „gespikt“ wurden). Soweit möglich bzw. verfügbar je ein potentiell kreuzreaktiver Analyt. Es ist darauf zu achten, dass bei der Prüfung Proben eingesetzt werden, die für den potentiell kreuzreaktiven Parameter stark bzw. hoch positiv sind (i.d.R. mindestens 10^5 TCID₅₀/ml oder 10^5 Kopien/ml).

Linearität: mindestens 2 Proben (positives oder positiv gespiktes Kontrollmaterial) werden in einer (1:10-er) Verdünnungsreihe (mit mindestens 4 Verdünnungsstufen) getestet. Der Test ist an zwei verschiedenen Tagen jeweils mindestens im Doppelansatz durchzuführen.

Matrixeffekt: Testung von verschiedenen, virushaltigen Untersuchungsmaterialien, die zur Durchführung des Parameters als Untersuchungsmaterial sinnvoll erscheinen, durch Aufstocken mit positivem Kontrollmaterial bzw. durch Abgleich der CT-Werte.

Anschließend sind die Abweichungen innerhalb der Serien und von Tag zu Tag zu beurteilen und die Ergebnisse bezüglich *Richtigkeit* und *Präzision* zu vergleichen. Darüber hinaus sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur *Sensitivität*, *Spezifität* und *Linearität* zu bewerten.

Neben den o.g. Überprüfungen erfolgt i.d.R. eine kontinuierliche Kontrolle der *Robustheit* des Verfahrens und der *Reproduzierbarkeit* von Messergebnissen i.d.R. durch das Mitführen von (quantitativ definierten) internen Run Controls (IRC), die aus Referenzmaterial, soweit verfügbar, hergestellt sind. Die IRC-Daten können zur Bewertung der Richtigkeit in den Validierungsbericht einfließen. Soweit Kontrollpanel verfügbar sind, sollten diese ggf. zusätzlich getestet werden.

8. Methodenüberprüfung bei kurzfristiger Umstellung eines Tests

In den Fällen, in denen aus analytischen oder organisatorischen Gründen (z.B. wegen Chargensperrung oder Lieferschwierigkeiten des Herstellers) eine kurzfristige Umstellung eines Tests erforderlich ist, sind im Rahmen der Methodenüberprüfung folgende Leistungsdaten zu überprüfen:

Methodenwechsel:

Mindestens 10 bereits mit dem alten Test analysierte Patientenproben müssen mit dem neuen Test untersucht werden und die gleichen / vergleichbare Ergebnisse liefern. Wenn nicht in jedem Fall übereinstimmende Ergebnisse gefunden werden, hat die Laborleitung zu entscheiden, ob die Methode freigegeben werden kann. Dies ist in den Unterlagen kurz zu begründen. Sollten jedoch bei mehr als drei Patientenproben keine übereinstimmenden Ergebnisse gefunden werden, kann der Test nicht freigegeben werden (sofern die Abweichungen nicht eindeutig auf eine sensitivere / spezifischere Analytik zurückzuführen sind). In begründeten Ausnahmefällen kann hiervon abgewichen werden.

Die Patientenergebnisse können nur dann freigegeben werden, wenn die Ergebnisse der Qualitätskontrollen innerhalb des zulässigen Bereichs liegen. Sollte der neue Test beibehalten werden, ist eine entsprechend erweiterte Validierung / Verifizierung nachzuholen.

In jedem Fall sollte nach Abschluss der Methodenüberprüfung die Teilnahme an einem Ringversuch oder einer Laborvergleichsprüfung angestrebt werden.

	Verfahrensanweisung zur Methodvalidierung	Seite 20 von 23
Datum:25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

9. Dokumentation

Alle Analysenergebnisse, die im Rahmen der Methodvalidierung / -verifizierung ermittelt werden sind zu dokumentieren und auszuwerten. Die dazugehörigen Rohdaten werden an das Formblatt angeheftet. Auf diesem Formblatt werden ebenfalls allgemeine Bemerkungen oder Hinweise notiert, die unter Umständen für die Analysendurchführung hilfreich sein könnten. Zusätzlich werden z.B. die Aufnahmen der Agarosegele auf bzw. an die Protokollblätter geheftet.

In den Fällen, wo umfangreiche Bemerkungen erforderlich sind, sind diese dem Formblatt als Anlage beizufügen. Alle Unterlagen zur Methodvalidierung / -verifizierung werden in einem dafür vorgesehenen Ordner im Büro des Laborleiters mindestens für die Dauer der Verwendung der Methode (und fünf Jahre darüber hinaus) aufbewahrt. Nach diesem Zeitraum entscheidet die Laborleitung über die weitere Archivierung.

	Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung	Seite 21 von 23
Datum: 25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

10. Kurzschemata zum Umfang der Validierung / Verifizierung (siehe Tab. 1- 3)

Tab. 1: Zusammenfassung zum Umfang der Testungen im Rahmen der Validierung / Verifizierung *serologischer Tests sowie Assays zum Nachweis viraler Antigene*. Angegeben ist die Mindestanzahl von zu testenden Proben sowie ggf. die Anzahl der Replikate (gekennzeichnet mit 0x)

Leistungs- kenn- daten	Probenan- forderungen	CE qualitativ	CE quantitativ	IHT qualitativ	IHT quantitativ
Sensitivität	positiv	nd	nd	10	10
	grenzwertig / schwach pos.	nd	nd	10	10
Spezifität	negativ	nd	nd	20	20
	potentiell kreuzreaktiv	nd	nd	3 je pot. kreuz-reakt. Parameter	3 je pot. kreuz-reakt. Parameter
Präzision (Intraassay)	positiv	1 (je 3x)	4 (je 3x)	1 (je 3x)	6* (je 3x)
	negativ	1 (je 3x)	3 (je 3x)	1 (je 3x)	3 (je 3x)
	grenzwertig / schwach pos.	1 (je 3x)	3 (je 3x)	1 (je 3x)	3 (je 3x)
Präzision (Interassay)	positiv	1 (1x an 2 d ^{**})	2* (1x an 2 d ^{**})	1 (1x an 2 d ^{**})	2* (je 1x an 2 d ^{**})
	negativ	1 (1x an 2 d ^{**})	1 (1x an 2 d ^{**})	1 (1x an 2 d ^{**})	1 (1x an 2 d ^{**})
	grenzwertig / schwach pos.	1 (1x an 2 d ^{**})	1 (1x an 2 d ^{**})	1 (1x an 2 d ^{**})	1 (1x an 2 d ^{**})
Linearität	positiv	nd	nd	nd	2 (je 2x) (1:10-er od. 1:5-er Verdünnungsreihe; mind. 4 Verd.-Stufen)
Matrixeffekte	positiv (n = 3)	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***
	negativ (n = 3)	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***
	grenzwertig / schwach pos. (n = 3)	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***
Methoden- vergleich	positiv (n = 7)	ggf. durchzuführen ****	ggf. durchzuführen ****	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***
	negativ (n = 7)	ggf. durchzuführen ****	ggf. durchzuführen ****	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***
	grenzwertig / schwach pos. (n = 6)	ggf. durchzuführen ****	ggf. durchzuführen ****	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***
Gesamtzahl durchzuführen- der Analysen		n = ≥15	n = ≥38	n = ≥55	n = ≥100

CE = vorkonfektionierter Test mit CE-Kennzeichnung; IHT = In-house-Test, nd = nicht durchzuführen / nicht erforderlich, d = Tage, * aus zwei versch. Konz.-Bereichen, ** d.h. zusätzlich zur Intraassay-Testung ist dieselbe Probe an zwei weiteren Tagen zu testen, *** je nach Anforderungen und Testgegebenheiten (z.B. Testung in verschiedenen U-Materialien) sind hier zusätzliche Tests durchzuführen – die Vorgaben werden durch den Laborleiter festgelegt, **** ggf. kann durch den Methodenvergleich die Testung der anderen Parameter entfallen bzw. eingeschränkt werden – die Entscheidung hierzu wird durch den Laborleiter getroffen und ist schriftlich zu begründen.

	Verfahrensanweisung zur Methodvalidierung	Seite 22 von 23
Datum: 25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

Tab. 2: Zusammenfassung zum Umfang der Testungen im Rahmen der Validierung / Verifizierung im Bereich *Virusisolierung*. Angegeben ist die Mindestanzahl von zu testenden Proben sowie ggf. die Mindestanzahl der Replikate (gekennzeichnet mit 0x)

Leistungsdaten	Probenanforderungen	IHT qualitativ
Suszeptibilität u. Präzision (sowie Prüfung auf Empfindlichkeit gegenüber zytotoxischen Stoffen)	positiv / schwach positiv (MOI 0,01 – 0,1)	3 (je 3x an 3 d)
	Proben aus der Routine	≥ 20
Matrixeffekte	positiv (n = 3)	ggf. durchzuführen *
	negativ (n = 3)	ggf. durchzuführen *
Gesamtzahl durchzuführender Analysen		n = ≥47

IHT = In-house-Test, d = Tage, * je nach Anforderungen und Testgegebenheiten (z.B. Testung in verschiedenen U-Materialien) sind hier zusätzliche Tests durchzuführen – die Vorgaben werden durch den Laborleiter festgelegt

	Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung	Seite 23 von 23
Datum: 25.10.2017	Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt	Version: C

Tab. 3: Zusammenfassung zum Umfang der Testungen im Rahmen der Validierung / Verifizierung *molekularbiologisch-virologischer Tests*. Angegeben ist die Mindestanzahl von zu testenden Proben sowie ggf. die Mindestanzahl der Replikate (gekennzeichnet mit 0x).

Leistungs- kenndaten	Probenan- forderungen	CE qualitativ	CE quantitativ	IHT qualitativ	IHT quantitativ	Kartusche qualitativ	Kartusche quantitativ
Sensitivität	positiv	nd	nd	10	10	nd	nd
	grenzwertig / schwach pos.	nd	nd	10	10	nd	nd
Spezifität	negativ	nd	nd	20	20	nd	nd
	potentiell kreuzreaktiv	nd	nd	soweit möglich bzw. verfügbar, 1 je pot. kreuzreakt. Parameter	soweit möglich bzw. verfügbar, 1 je pot. kreuzreakt. Parameter	nd	nd
Präzision (Intraassay)	positiv	1 (je 3x)	3 (je 3x)	1 (je 3x)	6* (je 3x)	nd	nd
	negativ	1 (je 3x)	3 (je 3x)	1 (je 3x)	3 (je 3x)	nd	nd
	grenzwertig / schwach pos.	1 (je 3x)	3 (je 3x)	1 (je 3x)	3 (je 3x)	nd	nd
Präzision (Interassay)	positiv	1 (1x an 2 d**)	1 (1x an 2 d**)	1 (1x an 2 d**)	2* (je 1x an 2 d**)	1 (je 1 x an 3 d)	2 (je 1 x an 3 d)
	negativ	1 (1x an 2 d**)	1 (1x an 2 d**)	1 (1x an 2 d**)	1 (1x an 2 d**)	1 (je 1 x an 3 d)	1 (je 1 x an 3 d)
	grenzwertig / schwach pos.	1 (1x an 2 d**)	1 (1x an 2 d**)	1 (1x an 2 d**)	1 (1x an 2 d**)	1 (je 1 x an 3 d)	2 (je 1 x an 3 d)
Linearität	positiv	nd	1 (2x) (1:10-er Verdün- nungsreihe - mindest. 3 Stufen)	2 (je 2x an 2 d) (1:10-er Verdün- nungsreihe - mindest. 4 Stufen)	2 (je 2x an 2 d) (1:10-er Verdün- nungsreihe - mindest. 4 Stufen)	nd	1 (1x) (1:10-er Verdün- nungsreihe***** - mindest. 3 Stufen)
Matrixeffekte	positiv (n = 3)	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***
	negativ (n = 3)	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***
	grenzwertig / schwach pos. (n = 3)	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***
Methoden- vergleich	positiv (n = 7)	ggf. durchzuführen ****	ggf. durchzuführen ****	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ****	ggf. durchzuführen ****
	negativ (n = 7)	ggf. durchzuführen ****	ggf. durchzuführen ****	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ****	ggf. durchzuführen ****
	grenzwertig / schwach pos. (n = 6)	ggf. durchzuführen ****	ggf. durchzuführen ****	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ***	ggf. durchzuführen ****	ggf. durchzuführen ****
Gesamtzahl durchzuführender Analysen		n = ≥15	n = ≥39	n = ≥87	n = ≥116	n = ≥9	n = ≥15

CE = vorkonfektionierter Test mit CE-Kennzeichnung; IHT = In-house-Test, nd = nicht durchzuführen / nicht erforderlich, d = Tage, * aus zwei versch. Konz.-Bereichen, ** d.h. zusätzlich zur intraassay-Testung ist dieselbe Probe an zwei weiteren Tagen zu testen, *** je nach Anforderungen und Testgegebenheiten (z.B. Testung in verschiedenen U-Materialien) sind hier zusätzliche Tests durchzuführen – die Vorgaben werden durch den Laborleiter festgelegt. **** ggf. kann durch den Methodenvergleich die Testung der anderen Parameter entfallen bzw. eingeschränkt werden – die Entscheidung hierzu wird durch den Laborleiter getroffen und ist schriftlich zu begründen. ***** die Testung kann ggf. mit der Interassay-Prüfung und den dabei verwendeten Proben „kombiniert“ werden.