

| | | |
|-------------------|---|----------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 1 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

Muster
Verfahrensanweisung: VA

Titel: Validierung von Methoden in der Virologie

Diese VA gilt ab:

Diese VA ersetzt die Fassung vom:

Zielsetzung und Limitierungen: In der vorliegenden Verfahrensweisung werden die Maßnahmen zur Methodenvvalidierung in der Virologie beschrieben. Erfasst werden davon zum Einen kommerziell hergestellte In-vitro-Diagnostika (IVD), bei denen im Rahmen der Familiarisierung die Richtigkeit und Präzision zu überprüfen sind und zum Anderen in-house-hergestellte IVDs. IVDs sind wie „Sonderanfertigungen“ (gemäß Anhang VIII der Medizinprodukte Richtlinie 93/42/EWG) zu behandeln. Die VA beschreibt die Einhaltung der grundlegenden Anforderungen gemäß Anhang I (Absatz A, 3 – insbesondere Leistungsparameter) der IVD Richtlinie 98/79/EG. 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.

Verteiler:

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

| | | |
|-------------------|--|-----------------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 2 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

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 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 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 Analyseergebnisse reproduzierbar erzielt werden können. Nach Prüfung und Bewertung aller Validierungsergebnisse erfolgt die Freigabe der Methode in die Routinediagnostik durch den Laborleiter.

| | | |
|------------------|---|----------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 3 von 23 |
| Datum:16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

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

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.

| | | |
|-------------------|---|----------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 4 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

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.



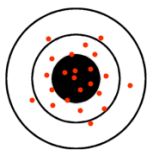
Präzise und richtig

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



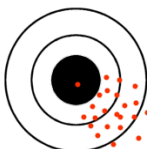
Präzise aber unrichtig

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 dem Schwarzen) als auch unpräzise (die Treffer streuen deutlich)

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

| | | |
|-------------------|---|----------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 5 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

Sensitivität: - Rate der echt positiven Ergebnisse

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

Sensitivität = $a / a + c$ (siehe auch Abb. 3).

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 richtige negativer Ergebnisse verglichen mit der Gesamtzahl der negativen Ergebnisse. Sie wird wie folgt ermittelt:

Spezifität = $d / d + b$ (siehe auch Abb. 3).

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

$$\text{Sensitivität der Prüfmethode} = a / a + c$$

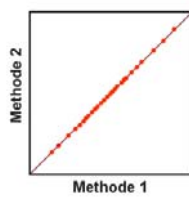
$$\text{Spezifität der Prüfmethode} = d / d + b$$

| | | | |
|------------------|------|----------------------------|------|
| | | Referenzmethode (= „wahr“) | |
| | | pos. | neg. |
| Prüf- methode | pos. | a | b |
| | neg. | c | d |

| | | |
|-------------------|---|----------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 6 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

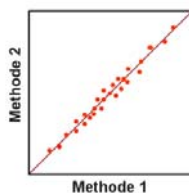
Methodenvergleich: Messung der Richtigkeit / Korrelation der (quantitativen) Einzelergebnisse aus zwei verschiedenen Tests zum Nachweis desselben Analyten (klassisches Verfahren ist die Korrelationsanalyse) (siehe Abb. 2).

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



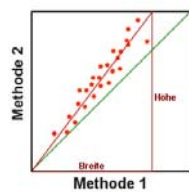
Ideale Korrelation

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.)



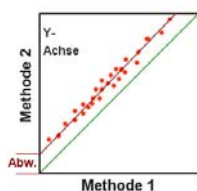
Gute Korrelation

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.

| | | |
|-------------------|---|----------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 7 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

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.

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).

| | | |
|-------------------|---|----------------|
| | Verfahrensanleitung zur Methodenvvalidierung | Seite 8 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

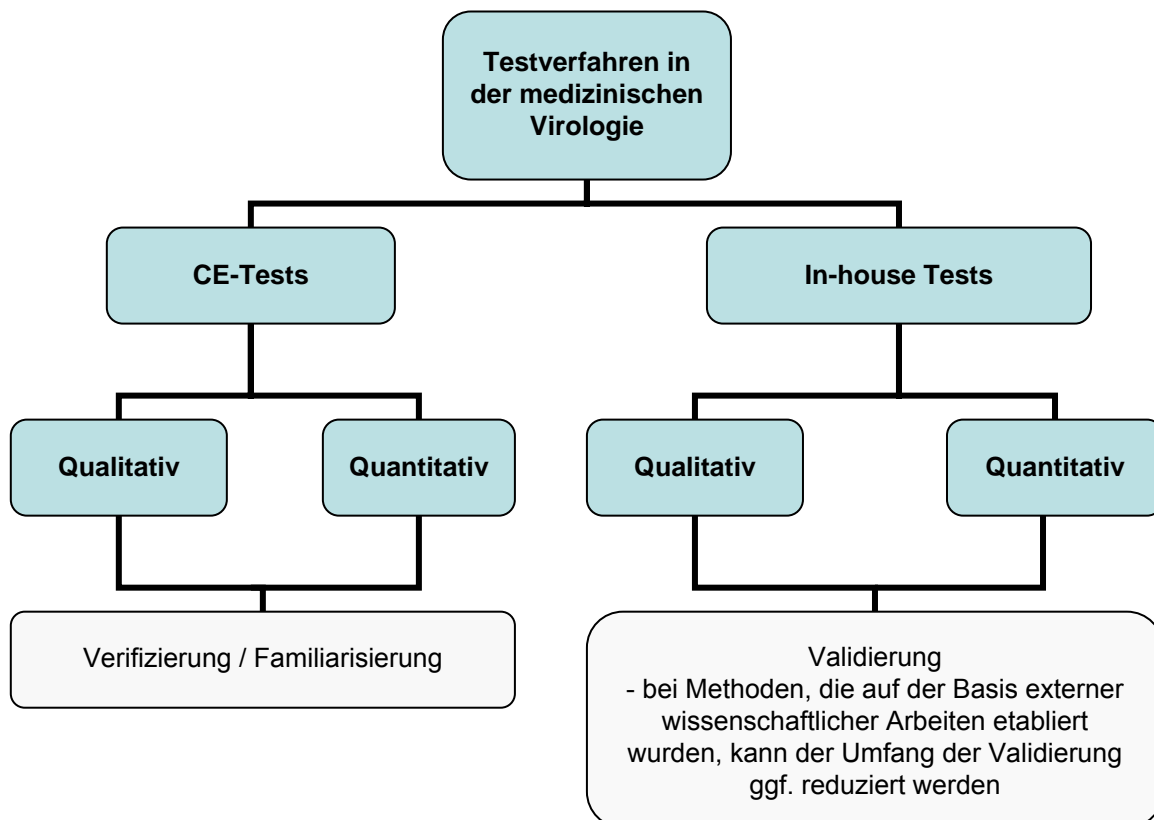
Definition und Einteilung der Testverfahren:

In der Routinediagnostik wird bezüglich der Validierung / Verifizierung von Test wie folgt differenziert:

„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.

„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.

Abb. 3: Einteilung der Methoden in der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik bezüglich der Erfordernisse an Methoden-Validierungen / Verifizierung



| | | |
|------------------|---|----------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 9 von 23 |
| Datum:16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

4. Allgemeine Anmerkungen

Zur Überprüfung von „CE-Tests“ vor Einsatz in die Routine ist es ausreichend eine **Verifizierung / Familiarisierung** von Seiten des Anwenders durchzuführen. Hiermit soll sichergestellt werden, dass die Methode vom Anwender beherrscht wird. Folgende Leistungskennndaten 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 Leistungskennndaten sind erneut zu ermitteln und zu validieren.

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

Eine orientierende Zusammenfassung der jeweiligen Anforderungen ist in den Tabellen 1-3 (S.19-22) 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 grundsätzlich alle (quantitativen) Ergebnisse, die im Rahmen der Methodenvvalidierung / -verifizierung ermittelt werden, die **Interassay-Präzision einen VK von ≤ 50 % aufweisen und die Intraassay-Präzision von 15-30% nicht überschreiten sollte.**

| | | |
|-------------------|---|-----------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 10 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

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

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 ein *Testvergleich* durchzuführen. Dazu wird eine statistisch angemessene Anzahl von Patientenproben (i.d.R. ca. 20) 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 Ergebnispaaire werden als Strichliste den entsprechenden Unterquadranten 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 ein *Testvergleich* durchzuführen. Dazu wird eine statistisch angemessene Anzahl von Patientenproben (i.d.R. ca. 20) 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 grafische Darstellung der Regressionsgeraden.

Im Folgenden werden die Validerungs-/Verifizierungskriterien für die Bereiche Infektionserologie (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 11 von 23 |
| Datum:16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

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. drei negative, drei schwach drei höher und eine 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.

| | | |
|------------------|---|-----------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 12 von 23 |
| Datum:16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

5.2 „In-house Tests“

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

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
- *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.

| | | |
|-------------------|---|-----------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 13 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

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

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. drei negative, drei schwach positive, drei höher und drei 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 Methodenvvalidierung | Seite 14 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

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: (Empfänglichkeit für Viren)* Dabei wird an 3 Tagen im Dreifachansatz die zu validierende Zelle mit dem jeweiligen Referenzstamm und zusätzlich – sofern vorhandenen – zwei Patientenisolaten infiziert. Dabei sollte wenn möglich mit titriertem Virus und eine „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 unterschreiten.

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

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

| | | |
|------------------|---|-----------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 15 von 23 |
| Datum:16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

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 Methodenvvalidierung erfolgt zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit:

- *Intraassay-Präzision:* mindestens je ein bekannt positives, ein bekannt negatives und ein schwach positives (ggf. grenzwertiges) Material wird am ersten Tag 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. drei negative, drei schwach und drei 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.

| | | |
|-------------------|---|-----------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 16 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

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 spiken, so dass die Endverdünnung in dem aufgestockten Material ca. 1 log-Stufe über der Nachweisgrenze liegt. Das Untersuchungsmaterial wird parallel ungespiked und gespiked in die Methode eingesetzt. Der Testansatz ohne Viruszusatz muss für diesen Virusnachweis negativ, die aufgestockte Probe positiv werden. Der Nachweis ist in zwei von einander unabhängigen Ansätzen zu verifizieren. Wird das aufgestockte 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.

| | | |
|-------------------|---|-----------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 17 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

- *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 Test bezüglich nahe verwandter Erreger, z.B. beim typen-unabhängigen Nachweis von HSV-DNA, ob die gleiche Sensitivität gegenüber HSV-1 und HSV-2 besteht.
- *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 aufgestockt 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 Probenmaterialien, 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.

| | | |
|-------------------|---|-----------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 18 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

„In-house Tests“: Quantitative Analysemethoden 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. drei negative, drei schwach positive, drei höher und drei 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 Test bezüglich nahe verwandter Erreger, z.B. beim typen-unabhängigen Nachweis von HSV-DNA, ob die gleiche Sensitivität gegenüber HSV-1 und HSV-2 besteht.
- *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 aufgestockt 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 Probenmaterialien, die zur Durchführung des Parameters als Untersuchungsmaterial sinnvoll erscheinen, durch Aufstocken mit positivem Kontrollmaterial bzw. durch Abgleich der CT-Werte.

| | | |
|-------------------|---|-----------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 19 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

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. Validierung 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 Methodenvvalidierung folgende Leistungsdaten zu überprüfen:

Methodenwechsel:

Mindestens 10 bereits mit dem alten Test analysierte Patientenproben müssen mit dem neuen Test untersucht werden und die gleichen Ergebnisse liefern. Wenn nicht in jedem Fall übereinstimmende Ergebnisse gefunden werden, hat der Laborleiter zu entscheiden, ob die Methode freigegeben werden kann und dies auf den Unterlagen kurz zu begründen. Sollte jedoch bei mehr als drei Patientenproben keine übereinstimmenden Ergebnisse gefunden werden, kann der Test nicht freigegeben werden. Nur 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 Methodenvvalidierung die Teilnahme an einem Ringversuch oder einer Laborvergleichsprüfung angestrebt werden.

| | | |
|-------------------|--|------------------------|
| | Verfahrensanleitung zur Methodenvvalidierung | Seite 20 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

9. Dokumentation

Alle Analyseergebnisse, die im Rahmen der Methodenvvalidierung 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 Methodenvvalidierung 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 der Laborleiter über die weitere Archivierung.

10. Kurzschemazum Umfang der Validierung / Verifizierung

Siehe Tabelle 1 - 3

| | | |
|-------------------|--|------------------------|
| | Verfahrensanweisung zur Methodenvvalidierung | Seite 21 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

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

| Leistungs- kenndaten | 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 intrassay-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 Methodenvvalidierung | Seite 22 von 23 |
| Datum: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

Tab. 2: Zusammenfassung zum Umfang der Testungen im Rahmen der Validierung / Verifizierung im Bereich Virusisolierung. Angegeben ist die notwendige Mindestanzahl von zu testenden Proben sowie ggf. die Mindestanzahl der Replikate

| Leistungskenndaten | 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: 16.08.2006 | Muster VA aus dem Institut für Medizinische Virologie Universitätsklinikum Frankfurt, Paul Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt | Version: A |

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

| Leistungs- kenndaten | 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 | soweit möglich bzw. verfügbar, 1 je pot. kreuz- reakt. Parameter | soweit möglich bzw. verfügbar, 1 je pot. kreuz-reakt. Parameter |
| Präzision (Intraassay) | positiv | 1 (je 3x) | 3 (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 ^{**}) | 1 (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 | 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) |
| 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 = ≥39 | n = ≥87 | n = ≥116 |

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 intrassay-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.