

AWMF	Muster VA aus dem Institut für	Qualitäts- management
		Dokumentangaben: Freigabe: 01.09.2021 Version: 001/9.2021 ID-Nr.: XYZ
Gültigkeitsbereich:		
Freigegeben von:	AutorInnen: AWMF-IVDR-Subgruppe Virologie - Mikrobiologie	Seite 1 / 45

In der vorliegenden Verfahrensanweisung werden Regelungen und Verantwortlichkeiten für die **Validierung / Verifizierung von im diagnostischen Laboratorium eingesetzten bzw. entwickelten und angewendeten Methoden zum Nachweis von Infektionserregern¹**

definiert

- Diese VA gilt ab:** 14 Tage nach dem Freigabedatum
- Diese VA ersetzt die:** 01.10.2021 Version: A
- Änderungshinweise:** Berücksichtigung der Verordnung (EU) 2017/746

Änderungen sind im Text grau unterlegt. Alle Änderungen zur vorherigen Version sind in der Gegenüberstellung beider Dokumente im Dokumentenlenkungssystem (XY) sichtbar.

Zur Kenntnisnahme verpflichtete Personen / Berufsgruppen:

alle Mitarbeiter im akkreditierten Bereich (IL, BL, LL, TA, QMB)

(IL = Institutsleitung, BL = Bereichsleitung, LL = Laborleitung, TA = Technische Mitarbeiter, QMB = Qualitätsmanagementbeauftragte(r))

Verteiler: Dokumentenlenkungssystem XY

Das vorliegende Dokument wurde in der IVDR-Subgruppe der adhoc-Kommission IVD der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) erstellt. Das Dokument ist nicht rechtsverbindlich und es stellt keine Handlungsanleitung im juristischen Sinn dar.

Autoren der Muster-VA:	Als Vertreter der:
Prof. Dr. Holger F. Rabenau Institut für Med. Virologie Universitätsklinikum Frankfurt Paul-Ehrlich-Str. 40, 60596 Frankfurt Mail: rabenau@em.uni-frankfurt.de	Gesellschaft für Virologie (GfV)
Prof. Dr. Jörg Hofmann Labor Berlin – Charité Vivantes Services GmbH Berlin	Gesellschaft für Virologie (GfV)
Dr. Axel Schubert Fa. Varicon, Ulm	Gesellschaft für Virologie (GfV)
Prof. Dr. Klaus-Peter Hunfeld Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin, Krankenhaus Nordwest, Frankfurt	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), INSTAND e.V., Düsseldorf
Prof. Dr. Udo Reischl Institute of Medical Microbiology and Hygiene University Hospital Regensburg	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), INSTAND e.V., Düsseldorf
Prof. Dr. Folker Spitzenberger Technische Hochschule Lübeck	Deutsche Gesellschaft für Pharmazeutische Medizin e.V. (DGPharMed)

¹ Im Medizinproduktegesetz werden diese „Methoden“ als „In-vitro-Diagnostika aus Eigenherstellung“ definiert. Die Verordnung (EU) 2017/746 enthält keine eigene Definition, sondern bezeichnet diese im Labor entwickelten Testsysteme als „Produkte, die ausschließlich innerhalb von in der Union ansässigen Gesundheitseinrichtungen hergestellt und verwendet werden“. Im englischsprachigen Raum werden diese Methoden als „Laboratory Developed Tests - LDT“ bezeichnet.

Inhalt

1. Zielsetzung / Zweck.....	3
2. Begriffe / Abkürzungen / Definitionen.....	5
3. Verantwortlichkeiten	10
4. Risiken des Verfahrens	11
5. Ablauf / Vorgehensweise.....	12
5.1 Tests in der Infektionsserologie.....	14
5.1.1 „CE-Tests“: Semiquantitative und qualitative Methoden in der Infektionsserologie.....	14
5.1.2 „CE-Tests“: Quantitative Methoden in der Infektionsserologie	14
5.1.3 „LDT“: Qualitative Methoden in der Infektionsserologie.....	15
5.1.4 „LDT“: Quantitative Methoden in der Infektionsserologie	15
5.2 Tests in der Erregeranzucht	16
5.2.1 „LDT“: Qualitative und semiquantitative Methoden in der Erregeranzucht.....	16
5.3 Tests in der molekularbiologische Erregerdiagnostik (NAT)	16
5.3.1 „CE-Tests“	16
5.3.2 „CE-Tests“: Unit-Use Testkartuschen zum qualitativen / quantitativen Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäure.....	17
5.3.3 „LDT“: Semiquantitative und qualitative Methoden in der Molekularbiologie	20
5.4 Methodenüberprüfung bei kurzfristiger Umstellung eines Tests	22
5.5 Dokumentation.....	22
6. Kontinuierliche Überwachung der LDT (nach erstmaliger Nutzung)	23
7. Dokumente / mitgeltende Unterlagen.....	23
8. Anlagen.....	23
8.1 Kurzschemata zum Umfang der Validierung / Verifizierung (siehe Tab. 1- 3)	24
9. Literatur.....	27
10. Muster-Validierungsplan u.a. zur Entwicklung eines LDT	28
11. Muster-Formblätter	29
11.1 Einführung eines neuen Untersuchungsverfahrens.....	29
11.2.1 LDT-Test (Kategorie II, III, IV): Methodvalidierung – Qualitativ.....	30
11.2.2 LDT-Test (Kategorie II, III, IV): Methodvalidierung – Quantitativ	35
11.3.1 CE-Test (Kategorie I): Methodenverifizierung – Qualitativ	40
11.3.2 CE-Test (Kategorie I): Methodenverifizierung – Quantitativ	42
11.4 Muster-Erklärung u.a. zu IVD aus Eigenherstellung und zur Umsetzung allgemeiner Anforderungen.....	45

1. Zielsetzung / Zweck

Unter Berücksichtigung der Anforderungen der Verordnung (EU) 2017/746 (In-Vitro Diagnostic Medical Devices Regulation, IVDR) werden in der vorliegenden Verfahrensanweisung (VA) die Maßnahmen zur Methodvalidierung / -verifizierung im Bereich der Virologie bzw. Mikrobiologie beschrieben.

Im Hinblick auf die IVDR-Anforderungen dient diese VA daher insbesondere der Erfüllung der Anforderungen nach IVDR, Artikel 5, Aufzählung g) („Erstellung von Unterlagen, die ein Verständnis ...der Auslegung und der Leistungsdaten der Produkte ermöglichen und die hinreichend detailliert sind“).

Zum vereinfachten Verständnis wird im gesamten Text stets nur Bezug genommen auf den Bereich „Virologie“ – jedoch gelten analoge bzw. spezifisch angepasste Vorgaben auch für den Bereich „Mikrobiologie“ bzw. allgemein für die Diagnostik von Infektionserregern.

Ebenfalls zur leichteren Lesbarkeit und gleichzeitig zur umfassenden Darstellung erfasst das vorliegende Dokument nicht nur solche In-vitro-Diagnostika (IVD), die vom Labor selbst entwickelt und hergestellt wurden (sogenannte Laboratory Developed Tests [LDT]) — sondern zusätzlich IVDs, die kommerziell hergestellt (und vom Hersteller validiert) wurden und bei denen im Rahmen der Implementierung im Labor die Richtigkeit und Präzision (Verifizierung) zu überprüfen sind.

Medizinische Laboratorien verschiedenster Fachrichtungen nutzen – häufig aus Mangel an geeigneten kommerziell verfügbaren Diagnostika und zur Sicherstellung der Patientenversorgung - eigenentwickelte Tests (LDT). Verschiedene Aspekte können die LDT-Nutzung begründen, z.B. die Performance Charakteristika der Tests (z.B. Sensitivität, Spezifität, Stabilität, Qualitätskontrollmechanismen), die „Turn-around-Zeit“, Multiplex- versus Monoplex-Teste, benötigte Materialmenge (Reagenzien, Untersuchungsmaterial), Art des Untersuchungsmaterials / -matrix u.a.). Die Begründung, warum ein LDT eingesetzt wird, ist nicht Gegenstand dieser VA, sondern ist an anderer Stelle (siehe auch Pkt. 10) darzustellen bzw. zu dokumentieren. Darin ist auch eine sog. LDT-Äquivalenzbegründung anzugeben, aus der hervorgeht, dass der mit dem LDT-IVD zu erzielende Zweck nicht oder nicht auf dem gewünschten Niveau durch ein gleichartiges, CE-gekennzeichnetes IVD erreicht werden kann. Zudem ist darin die von der IVDR (auch für LDT) geforderte „Produktbeobachtung“ in Art und Umfang der Dokumentation festzulegen.

Von der vorliegenden VA ebenfalls nicht erfasst werden:

- LDT-IVD, die nach der Verordnung (EU) 2017/746 - Anhang VIII (Klassifizierungsregeln) als Klasse D-Produkte klassifiziert und für die gleichzeitig CS (Common Specifications) bzw. CTS (Common Technical Specifications) verfügbar sind.
- Vorgaben zur konkreten Herstellung der LDT-IVD sowie die Maßnahmen zur Qualitätssicherung (im Sinne einer Chargenkontrolle, Haltbarkeit, Lagerungsbedingungen). Hierfür ist eine separate SOP zu erstellen und darauf zu verweisen. Zudem sind die Anforderungen nach IVDR, Anhang I, Abschnitte 9.2 und 9.3.² z.B. durch das kontinuierliche Mitführen und Dokumentieren von entsprechenden Qualitätskontrollen – im Sinne von „Robustheitskontrollen“ - sicherzustellen.
- Vorgaben zur Durchführung der Klassifizierung der LDT-IVD; hierfür ist ebenfalls eine separate SOP zu erstellen und darauf zu verweisen.

² „9.2. Die Leistungsmerkmale des Produkts bleiben während der vom Hersteller angegebenen Lebensdauer des Produkts erhalten.

9.3. Ist die Leistung der Produkte an die Verwendung von Kalibratoren und/oder Kontrollmaterialien gebunden, so wird die metrologische Rückverfolgbarkeit der Werte, die Kalibratoren und/oder Kontrollmaterialien zugewiesen wurden, durch geeignete metrologisch übergeordnete Referenzmessverfahren und/oder -materialien gewährleistet. Gegebenenfalls wird die metrologische Rückverfolgbarkeit der Werte, die Kalibratoren und Kontrollmaterialien zugewiesen wurden, durch zertifizierte Referenzmessverfahren oder -materialien gewährleistet.“

Die Inbetriebnahme des LDT ist auch im Rahmen der Verordnung (EU) 2017/746 weiterhin ohne die Einbeziehung einer Benannten Stelle und ohne Anbringung einer CE-Kennzeichnung zulässig. Mit Ausnahme der Erfüllung der anwendbaren Anforderungen nach Anhang I, IVDR und einiger in Artikel 5 Absatz 5 der IVDR gelisteten Anforderungen (z. B. Herstellung „in einem nicht-industriellen Maßstab“) sind eigenhergestellte Tests von den Anforderungen der Verordnung (EU) 2017/746 ausgenommen.

In der vorliegenden Verfahrensanweisung werden die Maßnahmen beschrieben, die - soweit möglich und unerlässlich - 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
 - Präzision (Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit),
 - Richtigkeit (Verzerrung), Genauigkeit (als Ergebnis von Richtigkeit und Präzision),
 - Linearität, analytische Sensitivität (Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen) sowie die
 - analytische Spezifität (Kontrolle der bekannten relevanten endogenen und exogenen Interferenzen und Kreuzreaktionen). Diese sind unter Einbeziehung geeigneter statistischer Instrumente zu prüfen.
- Ferner sind (ggf.) zu berücksichtigen:
 - Einordnung der LDT-IVD gemäß den IVD-Risikoklassen nach Anhang VIII, IVDR im Zusammenhang mit dem Dokument MDCG 2020-16 und ggf. Risikomanagement-basierter Validierungsumfang
 - Erreger-Bedeutung / -inzidenz (ggf. ist auch zu berücksichtigen, ob es sich z.B. um sehr seltene Erreger handelt). ,
 - Orphan-Analyt / Rare-Disease³ / Emerging (New) Disease
- Zudem ist – soweit anwendbar - die klinische Leistung zu ermitteln - wie diagnostische Sensitivität, diagnostische Spezifität, positiver prädiktiver Wert, negativer prädiktiver Wert, Likelihood-Verhältnis und erwartete Werte bei nicht betroffenen und betroffenen Bevölkerungsgruppen.“

Der Umfang der Überprüfung unterscheidet sich je nachdem, welche Anforderungen an die Methode gestellt werden, z. B. ob es sich um eine komplette Neueinführung / Neuentwicklung oder einen Wechsel des Untersuchungsverfahrens handelt.

Zudem ist zu berücksichtigen, ob es sich um ein im Labor selbst entwickeltes „LDT“ handelt, das in der wissenschaftlichen Literatur (die einem Peer-Review unterzogen wurde) beschrieben wurde, ein durch Expertengutachten /-stellungen / Fachgesellschaften anerkanntes Verfahren ist oder auf Ergebnissen aus Studien zum Nachweis des Wirkprinzips oder auf klinischen Leistungsstudien beruht. In den genannten Fällen ist davon auszugehen, dass adäquate Nachweise für die wissenschaftliche Validität des betrachteten Markers / Erregers vorliegen. In der IVDR (Anhang XIII, Teil A) wird diesbezüglich formuliert: „Gründlichkeit und Umfang dieser Bewertung sind verhältnismäßig und angemessen in Bezug auf die Merkmale des Produkts, einschließlich der Risiken, Risikoklasse, Leistung und Zweckbestimmung“.

³ EU: Aus dem Arzneimittelbereich kann orientierend die Verordnung (EG) Nr. 141/2000 zu Rate gezogen werden: Vom Leiden sind nicht mehr als fünf von zehntausend Personen betroffen. In der EU gibt es für den Medizinproduktebereich noch keine verbindlichen Definitionen oder quantitative Beschreibungen in dieser Hinsicht.
Für die USA gilt bei orphan drugs: Intended for the effective and safe treatment, prevention, or diagnosis of rare diseases with fewer than 200,000 people in the US; or which affect more than 200,000 people but where the costs of marketing and developing the products are not expected to be recovered.

Für spezielle methodisch komplexe (LDT) IVD – wie z.B. Sequenzieranalysen oder NGS (Next Generation Sequenzierung) - sind ggf. zusätzliche Regelungen und Vorgaben erforderlich, die jedoch nicht im Rahmen dieser VA behandelt werden. Dies gilt auch für weitere spezielle Fragenstellungen, wie z.B. die kombinierte Nutzung von CE-gekennzeichneten Testkomponenten (z. B. einer PCR) mit Testkomponenten (z. B. einem Extraktor), die hierfür nicht ausdrücklich vom Hersteller validiert / freigegeben wurden. Solche Extraktionssysteme können aber ein sog. Zubehör von IVD darstellen und müssen in solch einem Fall grundsätzlich einer Bewertung / Validierung im Sinne des Artikels 5 (5) der IVDR unterzogen werden (siehe auch Leitfaden der Medical Devices Coordination Group (MDCG) „MDCG 2020-16 - Guidance on Classification Rules for in vitro Diagnostic Medical Devices under Regulation (EU) 2017/746“, hier vor allem die Ausführungen zur Klassifizierungsregel 5). Bei solchen „CE- / non-CE-IVD-Kombinationen kann – mit entsprechender Begründung - ggf. eine Bewertung / Validierung nach den Vorgaben „LDT-Light“ erfolgen.

Erst wenn die Methode validiert bzw. verifiziert und freigegeben ist, dürfen Patientenergebnisse damit ermittelt und weitergegeben werden. In Einzelfällen kann hiervon und von den nachfolgend aufgeführten Vorgaben abgewichen werden, z. B. wenn eine extrem niedrige Krankheitsprävalenz und damit ein geringe Probenfrequenz vorhanden ist oder sie aufgrund eines Mangels an Kontrollen nicht durchführbar ist. Die Laborleitung legt dann (ggf. zusammen mit dem/der QMB und der leitenden technischen Assistenten) das geänderte Verfahren fest und begründet dies schriftlich.

Die im Folgenden aufgeführten Probenzahlen im Rahmen der Validierung bzw. Verifizierung sowie vergleichenden Testregimen gelten primär für solche Parameter, die üblicherweise täglich oder mehrfach wöchentlich durchgeführt werden. Dies gilt insbesondere für die erforderliche Anzahl der positiven Proben, die aus nachvollziehbaren Gründen nicht immer in dem genannten Umfang verfügbar sein könnten (vgl. ähnliche Regelungen bei sog. "orphan diseases"). Bei relativ selten durchgeführten Untersuchungen, die für das diagnostische Leistungsspektrum eines Labors und die zuverlässige Patientenversorgung aber dennoch essentiell sind (z.B. hochpathogene Erreger, langjährig etablierte Spezialfragestellungen, etc.) kann die genannte Probenzahl unterschritten werden. Dies muss jedoch im Einzelfall von der Laborleitung systematisch und gut nachvollziehbar dokumentiert werden.

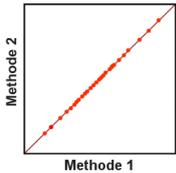
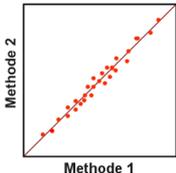
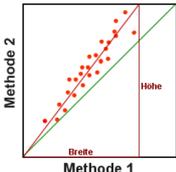
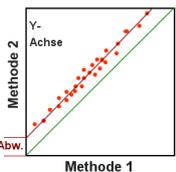
Nach der Definition in der IVDR und den Anforderungen nach Anhang XIII ist – soweit möglich und anwendbar - der „wissenschaftlichen Validität“ von LDT im Rahmen der sog. „Technischen Dokumentation“ besondere Beachtung zu schenken – ebenso wie den Daten zur Analyse- und klinischen Leistung, ihre Bewertung und der daraus abgeleitete klinische Nachweis sind in einem Bericht zu dokumentieren. Diese Daten müssen ggf. während des gesamten Lebenszyklus des Produkts aktualisiert werden.

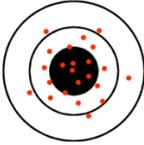
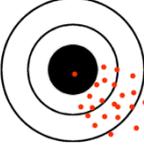
2. Begriffe / Abkürzungen / Definitionen

Im Rahmen dieser VA gelten folgende Definitionen

Analyseleistung	bezeichnet die Fähigkeit eines Produkts, einen bestimmten Analyten korrekt nachzuweisen oder zu messen (Quelle: IVDR, Artikel 2, 40. Aufzählungspunkt)
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.
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 „ <i>Verifizierung</i> “ vornehmen.
diagnostische Sensitivität	bezeichnet die Fähigkeit eines Produkts, zu erkennen, dass ein mit einer bestimmten Krankheit oder einem bestimmten gesundheitlichen Zustand verbundener Zielmarker vorhanden ist (Quelle: IVDR, Artikel 2, 50. Aufzählungspunkt)
diagnostische Spezifität	bezeichnet die Fähigkeit eines Produkts, zu erkennen, dass ein mit einer bestimmten Krankheit oder einem bestimmten gesundheitlichen Zustand verbundener Zielmarker nicht vorhanden ist (Quelle: IVDR, Artikel 2, 49. Aufzählungspunkt)
klinische Leistung	bezeichnet die Fähigkeit eines Produkts, Ergebnisse zu liefern, die mit einem bestimmten klinischen Zustand oder physiologischen oder pathologischen Vorgang oder Zustand bei einer bestimmten Zielbevölkerung und bestimmten vorgesehenen Anwendern korrelieren (Quelle: IVDR, Artikel 2, 41. Aufzählungspunkt)
klinischer Nachweis	bezeichnet die klinischen Daten und die Ergebnisse der Leistungsbewertung zu einem Produkt, die in quantitativer und qualitativer Hinsicht ausreichend sind, um qualifiziert beurteilen zu können, ob das Produkt sicher ist und den angestrebten klinischen Nutzen bei bestimmungsgemäßer Verwendung nach Angabe des Herstellers erreicht (Quelle: IVDR, Artikel 2, 36. Aufzählungspunkt)
Korrelationskoeffizient (r)	Bestimmt den Grad des Zusammenhanges der Stichproben im Idealfall = 1. Die Berechnung von r erfolgt durch: $r = \sqrt{b_{yx} \times b_{xy}}$
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 - Referenzmaterial – dabei sollte ein ausgewogenes Maß an positiven und negativen Proben getestet werden).
LDT	- Bei Laboratory Developed Tests (LDT) handelt es sich um Methoden, die vom Labor selbst entwickelt wurden oder auf der Basis externer wissenschaftlicher Arbeiten etabliert sind. LDT sind also definiert als selbst entwickelte und validierte Untersuchungsverfahren, in welchen Reagenzien, Kits, Kontrollen, Geräte ohne CE-Kennzeichnung oder in Kombination von CE- und nicht CE-gekennzeichneten Komponenten für in-vitro-diagnostische Zwecke eingesetzt werden. Auch zählen darunter die Verwendung CE-gekennzeichneter IVD, die außerhalb der Angaben in Produktinformationen des Herstellers genutzt werden („Off Label Use“), und von Tests ohne CE-Kennzeichnung mit dem Vermerk 'Research Use Only' (RUO-Produkte). Die Laborleitung ist in diesem Fall für den Nachweis der Eignung der Methode in der entsprechenden Anwendung verantwortlich („ <i>Validierung</i> “). Bei Methoden, die auf der Basis externer wissenschaftlicher Arbeiten etabliert wurden, kann der Umfang der Validierung ggf. reduziert werden (siehe Abb. 4). Die Daten zur wissenschaftlichen Validität des Tests, zur Analyse- und klinischen Leistung, ihre Bewertung und der daraus abgeleitete klinische Nachweis sind in einem Bericht zu dokumentieren. Dieser ist Bestandteil der Dokumentation und muss ggf. während des gesamten Lebenszyklus des Produkts anhand der Daten aktualisiert werden.
„LDT-Light“	- Unter dem Begriff „LDT-Light“ werden u.a. (kommerziell verfügbare) IVD zusammengefasst, die in modifizierter Form bzw. mit Modifikationen eingesetzt werden und daher ggf. nur im reduzierten Umfang zu validieren sind. Unter Modifikationen sind i.d.R. zusätzliche Untersuchungsmaterialien zu verstehen, die in Zusammensetzung und Komplexität dem vorgesehenen Material entsprechen, vom Hersteller aber nicht aufgeführt werden. In die Kategorie „LDT-Light“ können ggf. auch kommerziell angebotene RUO-Teste eingruppiert werden oder z.B. die kombinierte Nutzung von CE-gelabelten Testkomponenten (z.B. einer PCR) mit Testkomponenten (z.B. einem Extraktor), die hierfür nicht ausdrücklich vom Hersteller validiert / freigegeben wurden. Der Umfang der Validierung ist dann ggf. individuell anzupassen und zu begründen - z.B. in Abhängigkeit des vom Hersteller / Anbieter bereits durchgeführten Validierungsumfangs respektive, ob ein „RUO-Test“ vormals als CE-IVD kommerziell vertrieben wurde bzw. entsprechende Daten (z.B. durch intern eingesetzte Kontrollen) zur kombinierten Nutzung von Testkomponenten vorliegen.

<p>Leistung eines IVD</p>	<p>bezeichnet die Fähigkeit eines Produkts, seine vom Hersteller angegebene Zweckbestimmung zu erfüllen; sie besteht in der Analyseleistung und gegebenenfalls der klinischen Leistung zur Erfüllung dieser Zweckbestimmung (Quelle: IVDR, Artikel 2, 39. Aufzählungspunkt).</p>
<p>Linearität</p>	<p>- 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.</p>
<p>Methodenvergleich</p>	<p>Messung der Richtigkeit / Korrelation der (quantitativen) Einzelergebnisse aus zwei verschiedenen Tests zum Nachweis desselben Analyten (klassisches Verfahren ist die Korrelationsanalyse) (siehe Abb. 1).</p> <p>Abb. 1: Darstellung der Korrelation beim Vergleich von zwei Methoden</p> <div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 10px;"> <div data-bbox="384 792 560 965">  <p>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.)</p> </div> <div data-bbox="384 1025 560 1198">  <p>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.</p> </div> <div data-bbox="384 1308 560 1480">  <p>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.</p> </div> <div data-bbox="384 1637 560 1809">  <p>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.</p> </div> </div>
<p>negativer prädiktiver Wert</p>	<p>bezeichnet die Fähigkeit eines Produkts, für ein bestimmtes Attribut in einer bestimmten Bevölkerung echt-negative Ergebnisse von falsch-negativen Ergebnissen zu trennen (Quelle: IVDR, Artikel 2, 53. Aufzählungspunkt)</p>
<p>positiver prädiktiver Wert</p>	<p>bezeichnet die Fähigkeit eines Produkts, für ein bestimmtes Attribut in einer bestimmten Bevölkerung echt-positive Ergebnisse von falsch-positiven Ergebnissen zu trennen (Quelle: IVDR, Artikel 2, 52. Aufzählungspunkt)</p>

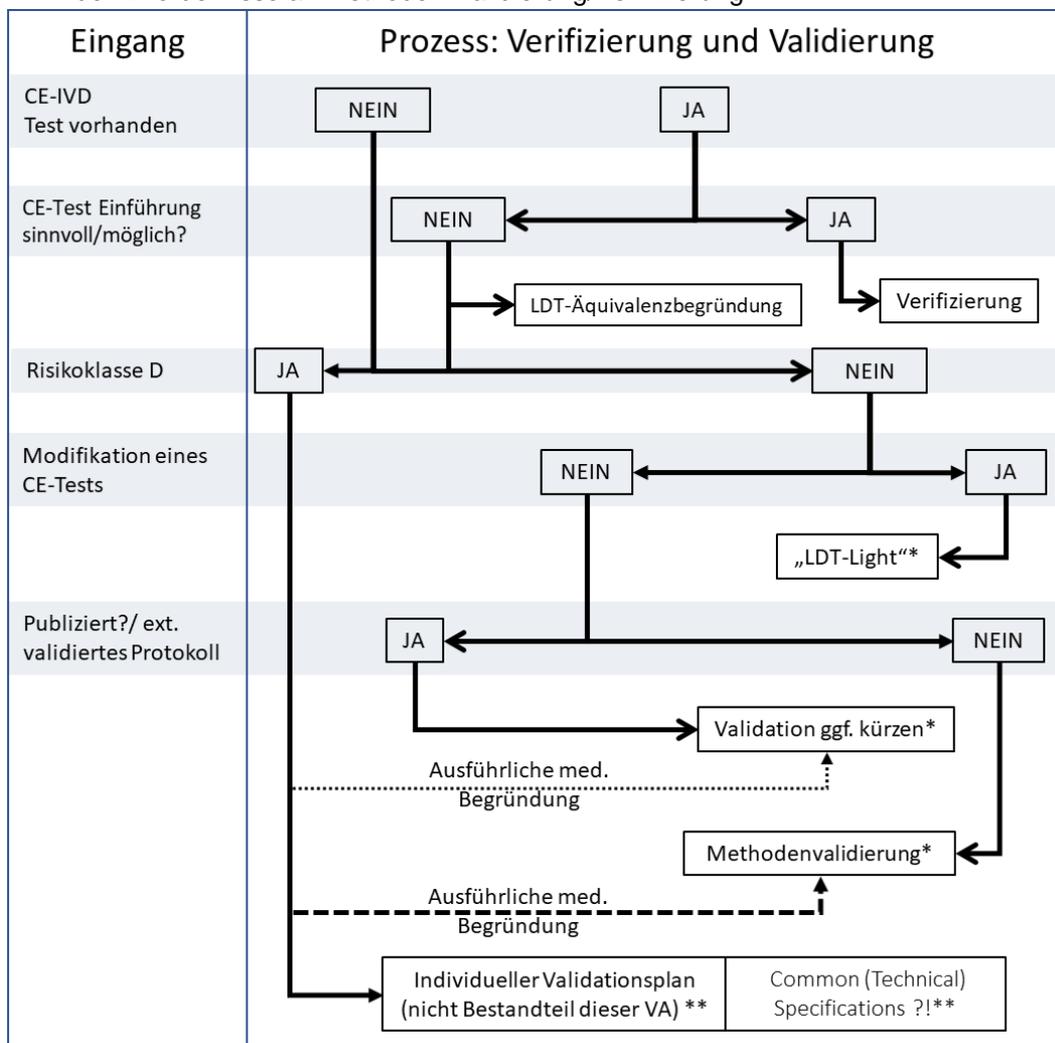
<p>prädiktiver Wert</p>	<p>bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, dass eine Person mit einem mithilfe des Produkts gewonnenen positiven Testergebnis den Zustand, der Gegenstand der Untersuchung ist, aufweist, bzw. dass eine Person mit einem mithilfe des Produkts gewonnenen negativen Testergebnis einen bestimmten Zustand nicht aufweist (Quelle: IVDR, Artikel 2, 51. Aufzählungspunkt)</p>
<p>Präzision</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Reproduzierbarkeit - Wiederholgenauigkeit eines Labortests - Intra-Assay-Varianz - Inter-Assay-Varianz <p>Grad der Übereinstimmung zwischen den einzelnen unabhängigen Messergebnissen (siehe Abb. 2). 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“ (Intra-Assay) bezeichnet. Die „Präzision von Analysenserie zu Analysenserie“ (Inter-Assay) 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) bei quantitativen Messverfahren berechnet. Bei qualitativen Verfahren wird die Wiederholgenauigkeit bzw. Reproduzierbarkeit betrachtet.</p> <p>Abb. 2: Präzision und Richtigkeit: Im allgemeinen Sprachgebrauch werden oft Ausdrücke wie "genau", "richtig" oder "präzis" vermischt. Die folgenden Abbildungen machen die Unterschiede an Hand der Treffgenauigkeit eines Schützen deutlich.</p> <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: flex-start;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;">  <div style="margin-left: 10px;"> <p>Präzis und richtig Der Schütze schießt präzis (immer etwa an die gleiche Stelle) und richtig (mitten ins Schwarze)</p> </div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;">  <div style="margin-left: 10px;"> <p>Präzis aber unrichtig Dieser Schütze schießt auch präzis (immer etwa an die gleiche Stelle) aber unrichtig (immer rechts unten daneben)</p> </div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;">  <div style="margin-left: 10px;"> <p>Richtig aber unpräzis Dieser Schütze schießt zwar richtig (die Treffer streuen um das Schwarze) aber unpräzis (die Treffer streuen deutlich)</p> </div> </div> <div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="margin-left: 10px;"> <p>Unrichtig und unpräzis Dieser Schütze schießt sowohl unrichtig (die Treffer liegen unter und neben dem Schwarzen) als auch unpräzis (die Treffer streuen deutlich)</p> </div> </div> </div> <p style="text-align: right; font-size: small;">aus: http://www.med4you.at/laborbefunde/allgemeines/lbef_qualitaet.htm#Pr</p>
<p>Richtigkeit</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Vergleich der Messwerte mit Referenzwerten - Ermittlung und Bewertung der systematischen Messabweichung <p>Grad der Übereinstimmung zwischen den in größerer Serie ermittelten Messergebnissen sowie ihres Mittelwertes und einem wahren Wert (anerkannter Referenzwert) (siehe Abb. 3). 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</p>

	die einzelnen Werte streuen.															
RUO	„Research use only“ - ein Reagenz, das im Wesentlichen für Forschungszwecke und nicht für in-vitro-diagnostische Zwecke eingesetzt werden soll. RUO bedeutet jedoch keine Einschränkung hinsichtlich der Qualität. RUO-Reagenzien tragen keine CE-Kennzeichnung. Der Validierungsumfang entspricht häufig nicht dem eines IVD. Neben RUO werden z.T. auch andere Begrifflichkeiten mit ähnlicher, aber nicht identischer Bedeutung genutzt (z.B. „investigational use only“ (IUO) oder „analyte specific reagent“ (ASR))															
Semiquantitativ	- Der Begriff „semiquantitativ“ wird hier in Anlehnung an die RiLiBÄK verwendet – – d.h. wenn für Werte eine Ordnungsbeziehung besteht (Ordinalskala): z. B. Titerstufe, + bis +++, Angabe eines Wertebereichs. Hingegen sind Nominalmerkmale qualitative Merkmale, wenn für deren Werte keine Ordnungsbeziehung besteht (Nominalskala): z. B. nachweisbar, nicht nachweisbar. Lassen sich Werte allerdings einer Skala zuordnen, auf der Abstände definiert sind (Metrische oder Kardinalskala), handelt es sich im Regelfall um quantitative Merkmale. Bei z.B. Ct-Werten (im Bereich der PCR-Diagnostik) findet dieses „quantitative Merkmal“ allerdings eine semiquantitative Zuordnung. Entscheidend ist, wie das Ergebnis im Befund angegeben wird (Skalenniveau).															
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. 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 richtig 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. <i>Sensitivität</i> der Prüfmethode = $a / a + c$ <i>Spezifität</i> der Prüfmethode = $d / d + b$ <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td colspan="2"></td> <td colspan="2" style="text-align: center;">Referenzmethode (= „wahr“)</td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> <td style="text-align: center;">pos.</td> <td style="text-align: center;">neg.</td> </tr> <tr> <td rowspan="2" style="vertical-align: middle;">Prüf- methode</td> <td style="text-align: right;">pos.</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">a</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">b</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">neg.</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">c</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">d</td> </tr> </table>			Referenzmethode (= „wahr“)				pos.	neg.	Prüf- methode	pos.	a	b	neg.	c	d
		Referenzmethode (= „wahr“)														
		pos.	neg.													
Prüf- methode	pos.	a	b													
	neg.	c	d													

Validierung / Verifizierung

In der Routinediagnostik wird bezüglich der Validierung / Verifizierung von Test wie folgt differenziert (siehe Abb. 4) – im Rahmen einer umfassenden Darstellung, erfasst das vorliegende Dokument neben LDT-IVD auch solche, die kommerziell hergestellt und vom Hersteller validiert wurden (CE-markierte Tests). Vor Beginn der Validierungsarbeiten ist ein entsprechend detaillierter Validierungsplan zu erstellen:

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



* siehe auch Abschnitt „10. Muster-Validierungsplan“ und Abschnitt „5. Ablauf / Vorgehensweise“
** siehe auch Abschnitt „1. Ziel und Zweck“

Wissenschaftliche Validität eines Analyten

bezeichnet den Zusammenhang eines Analyten mit einem bestimmten klinischen oder physiologischen Zustand (Quelle: IVDR, Artikel 2, 38. Aufzählungspunkt)

3. Verantwortlichkeiten

	Verantwortlichkeit	unterstützend
Sicherstellung, dass nur validierte / verifizierte Methoden für die Untersuchungsdurchführung verwendet werden	LL	QMB, Abteilungsleitung
Festlegung der Art und des Umfangs der zu überprüfenden Leistungsdaten – Erstellung eines Validierungsplans	LL	QMB, Abteilungsleitung

Erstellung einer Risikobewertung	LL	QMB, Abteilungsleitung
Entscheidung, ob mit den ermittelten Ergebnissen die Zuverlässigkeit und Leistungsfähigkeit der Methode in der Weise gewährleistet werden kann, dass valide Analysenergebnisse reproduzierbar erzielt werden können und somit die Anforderungen nach IVDR, Anhang I erfüllt werden	LL	QMB, Abteilungsleitung
Festlegung der Akzeptanzkriterien	LL	QMB, Abteilungsleitung
Prüfung und Bewertung aller Validierungs- / Verifizierungsergebnisse	LL	QMB, Abteilungsleitung
Freigabe der Methode für die Routinediagnostik	LL	
Monitoring der Methode	LL	QMB, Abteilungsleitung

4. Risiken des Verfahrens

Es ist ein Risikomanagementsystem festzulegen, umzusetzen, zu dokumentieren und fortzuführen. Das Risikomanagement ist als kontinuierlicher iterativer Prozess während des gesamten Lebenszyklus eines Produkts zu verstehen, der eine regelmäßige systematische Aktualisierung erfordert.

Risiko	Maßnahmen zur Risikominimierung
Erzeugen nicht valider Ergebnisse	Verifizierung / Validierung Unterstützend: Einarbeitungskonzept, Erstellen von SOPs, Mitführen von IRCs, Prüfmittelüberwachung
Nicht-Vergleichbarkeit der Ergebnisse	Verifizierung / Validierung
Test- / Hersteller bedingte Schwächen nicht erkennen	Verifizierung / Validierung Unterstützend: Mitführen von IRCs, Prüfmittelüberwachung
Keine Familiarisierung mit der Testdurchführung	Unterstützend: Einarbeitungskonzept, Erstellen von SOPs, Mitführen von IRCs, Prüfmittelüberwachung
Falsche Zuordnung der zutreffenden IVD-Risikoklasse mit der Konsequenz einer ggf. nicht ausreichenden Validierungsdokumentation	Review der Zuordnung der IVD-Risikoklasse nach Anhang VIII, IVDR, nach ggf. vorhandenen CS und nach MDCG 2020.16 nach dem Vier-Augen-Prinzip und unter Freigabe durch die QM-Abteilung bzw. RA-Abteilung, sofern vorhanden.

Hierzu wird / werden:

- a) ein Risikomanagement-Plan für jedes Produkt festgelegt und dokumentiert
- b) die bekannten und vorhersehbaren Gefährdungen, die mit jedem Produkt verbunden sind, bestimmt und analysiert
- c) die Risiken, die mit der bestimmungsgemäßen Verwendung und einer vernünftigerweise vorhersehbaren Fehlanwendung verbunden sind bzw. bei ihr auftreten, eingeschätzt und bewertet
- d) die Auswirkungen der in der Fertigungsphase, insbesondere durch das System zur Überwachung nach dem Inverkehrbringen gewonnenen Informationen auf Gefährdungen und deren Häufigkeit, auf Schätzungen zu den verbundenen Risiken sowie auf das Gesamtrisiko, das Nutzen-Risiko-Verhältnis und die Risikoakzeptanz bewertet.

5. Ablauf / Vorgehensweise

Zur Überprüfung von „**CE-Tests**“ vor Einsatz in die Routine ist es ausreichend eine **Verifizierung** von Seiten des Anwenders durchzuführen (siehe Abb. 4). Hiermit soll sichergestellt werden, dass die Methode vom Anwender beherrscht wird.

Folgende Leistungsdaten sind zu überprüfen:

- Richtigkeit und
- Präzision (Intra-Assay und Inter-Assay)

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.

Hinweis: In begründbaren Einzelfällen, kann die Freigabe von Untersuchungsverfahren ohne eine vollständig abgeschlossene Verifizierung erfolgen. Darunter fallen z.B. besondere epidemiologische Ausnahmefälle oder besondere Umstände⁴ (z.B. gleichzeitige Umstellung von mehr als 10 Untersuchungsverfahren – bei Gerätewechsel / -ausfall oder Änderung der Räumlichkeiten/Umzug). In diesen Fällen wird die Verifizierung nach bereits erfolgter Freigabe abgeschlossen. Signifikante Abweichungen vom Verifizierungsplan müssen dabei schriftlich begründet werden. Dies beinhaltet eine Risikoanalyse, so wie eine fachliche Stellungnahme durch die Institutsleitung.

Für jedes „**LDT**“ wird vor Einführung eine Risikoanalyse / Risikobewertung durchgeführt und ggf. entsprechende Vorbeugemaßnahmen getroffen. Die fortlaufende Überwachung des LDT erfolgt mittels dem etablierten Fehler- und Maßnahmenmanagement. Die Erfahrungen für jedes LDT werden im Managementreview bewertet.

Im Rahmen der Validierung von „LDT“ ist ein Validierungsplan, der das Vorgehen sowie die Akzeptanzkriterien beschreibt, zu erstellen (siehe Abb. 4).

Zu überprüfen sind:

- Präzision (Intra-Assay und Inter-Assay)
- Richtigkeit (Verzerrung)
- Genauigkeit (als Ergebnis von Richtigkeit und Präzision),
- Linearität (quantitative Testsysteme) bzw. die Nachweisgrenze (qualitative Tests)
- Spezifität (Kontrolle der bekannten relevanten endogenen und exogenen Interferenzen und Kreuzreaktionen)
- Sensitivität (Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen)

- Zudem ist – soweit anwendbar - die klinische Leistung zu ermitteln - wie diagnostische Sensitivität, diagnostische Spezifität, positiver prädiktiver Wert, negativer prädiktiver Wert, Likelihood-Verhältnis und erwartete Werte bei nicht betroffenen und betroffenen Bevölkerungsgruppen.“

Sowohl für die Verifizierung CE-Tests, als auch für Validierung von LDT gilt:

Bei der Bestimmung der Reproduzierbarkeit von „negativen“ Proben ist – zumindest in vielen Fällen - 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

⁴ Untersuchungsverfahren der Risikoklasse D ((EU) 2017/746; IVDR) sind i.A. hiervon ausgeschlossen.

Verfahrens und die *Reproduzierbarkeit* von Messergebnissen zu überwachen. Solche Testkit-unabhängigen IRC sind insbesondere bei Chargenwechseln sinnvoll. 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 die Laborleitung entscheiden, ob die Erprobung abgebrochen oder nach methodischen Verbesserungen erneut gestartet oder nach (begründeter) Erweiterung der Grenzen fortgesetzt werden soll.

Es gilt, dass im Falle der Abweichung von den Vorgaben dieser VA bei der Validierung / Verifizierung dies stets zu begründen ist. Die Laborleitung 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, dass bei serologischen und Zellkultur-basierten Testsystemen grundsätzlich alle (quantitativen) Ergebnisse, die im Rahmen der Methodvalidierung / -verifizierung ermittelt werden, die Inter-Assay-Präzision einen VK von $\leq 50\%$ aufweisen und die Intra-Assay-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 die Laborleitung zu bewerten.

Hierbei ist auch zu berücksichtigen, dass sich bei vergleichenden Bestimmungen aus inhomogenem Probenmaterial (z.B. Wundabstriche, Biopsien, BAL, Biofilm auf Prothesenmaterial, Katheter etc.) und/oder bei Erregergruppen, die in der Regel inhomogen im nativen Probenmaterial verteilt sind (z.B. Mykobakterien, Parasiten, u.ä.), methodenbedingt deutliche Unterschiede in den Ergebnissen ergeben können.

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

Bei (semi)quantitativen molekularbiologischen Testsystemen sollte, wenn keine anderen Vorgaben vorliegen, die Inter-Assay-Präzision $\pm 1 \log_{10}$ (oder 3,3 CT/CP/CQ) und die Intra-Assay-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.

Methodenwechsel bei semiquantitativen und qualitativen Tests

Wurde der zu untersuchende Parameter bisher schon mit einer anderen Methode bestimmt, ist – zusätzlich zu den unter Pkt. 5.1 – 5.3 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 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.

Methodenwechsel bei quantitativen Tests

Wurde der zu untersuchende Parameter bisher schon mit einer anderen Methode bestimmt, ist – *zusätzlich* zu den unter Pkt. 5.1 – 5.3 aufgeführten Anforderungen - ein *Testvergleich* durchzuführen. Dazu wird eine statistisch angemessene Anzahl von Patientenproben (i.d.R. ca. 20 Proben [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.

5.1 Tests in der Infektionsserologie

5.1.1 „CE-Tests“: Semiquantitative⁵ und qualitative Methoden in der Infektionsserologie

Bei semiquantitativen und qualitativen „CE-Tests“ wird ein Ergebnis innerhalb bestimmter Werteklassen ermittelt. Hier wird die Methode folgendermaßen überprüft:

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit:

Intra-Assay-Präzision: mindestens je ein bekannt positives, ein bekannt negatives und ein schwach positives / grenzwertiges⁶ Material wird am ersten Tag in Dreifachbestimmung untersucht. Die Matrix dieser Kontrollen sollte dabei dem Patientenmaterial entsprechen.

Inter-Assay-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 – soweit möglich - Präzision zu vergleichen.

5.1.2 „CE-Tests“: Quantitative Methoden in der Infektionsserologie

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

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit:

Intra-Assay-Präzision: mindestens 10 verschiedene Proben (Referenzmaterial, Patientenproben oder Poolserum), d.h. 3 negative, 3 schwach, 3 höher und 1 stark positive

⁵ siehe hierzu auch Abschnitt 2 „Begriffe / Abkürzungen / Definitionen“

⁶ Die in den Kapiteln 5.1, 5.3 und 8.1 verwendeten Begriffe zu Vorgaben der zu analysierenden Untersuchungsmaterialien sind im Sinne dieser VA wie folgt definiert: als „grenzwertig“ gilt das 2- bis 5-fache der unteren Nachweisgrenze des jeweiligen Testsystems (z.B. einer PCR) , als „schwach“ positiv wird eine Probe bewertet, bei der die Menge an Analyt (z.B. zu bestimmender Nukleinsäure) das 20- bis 50-fache der unteren Nachweisgrenze des jeweiligen Testsystems (z.B. einer PCR) beträgt – die Definition kann bei Bedarf durch die Laborleitung begründet angepasst werden.

Probe(n) sind am ersten Tag in Dreifachbestimmung zu untersuchen. Die Matrix dieser Kontrollen sollte dabei dem Patientenmaterial entsprechen.

Inter-Assay-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.

5.1.3 „LDT“: Qualitative Methoden in der Infektionsserologie

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

Intra-Assay-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.

Inter-Assay-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.

5.1.4 „LDT“: Quantitative Methoden in der Infektionsserologie

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

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit:

Intra-Assay-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.

Inter-Assay-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 Erreger derselben Familie aufweisen, Rheumafaktor (Gewebsautoantikörper) positive Seren, Seren mit anderen Autoantikörpern – für Antigenteste gilt: Proben mit Erregern 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.

5.2 Tests in der Erregeranzucht

5.2.1 „LDT“: Qualitative und semiquantitative Methoden in der Erregeranzucht

Für die Validierung in der Erreger (Viren, Bakterien)-Isolierung gilt:

Bei der Anzucht ist vor allem die Eignung der Nährmedien und Zellen für entsprechende Erreger zu testen. Neue Anzuchtverfahren werden nur dann in die Routine eingeführt, wenn folgende Parameter überprüft wurden:

Suszeptibilität: Dabei wird an 3 Tagen im Dreifachansatz die zu validierende Anzuchtmethode mit dem (*Empfänglichkeit für Erreger*) jeweiligen Referenzstamm und zusätzlich – sofern vorhandenen – zwei Patientenisolaten infiziert. Dabei sollte, wenn möglich, der Erreger titriert sein und mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 0,01 – 0,1 gearbeitet werden. Im Rahmen der Suszeptibilitätsprüfung sollte – soweit anwendbar und sinnvoll - auch ein *Methodenvergleich* durchgeführt werden. Dabei werden in der laufenden Routine die zu validierende Methode neben der „Routinemethode“ parallel mit den Patientenproben beimpft und täglich überprüft.

zytotoxische Effekte von Stoffen oder Probenmaterial auf die Kultur (Matrixeffekte):

Die Abklärung erfolgt i.d.R. im Rahmen des Methodenvergleichs (s.o.) 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 die Laborleitung 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.

5.3 Tests in der molekularbiologische Erregerdiagnostik (NAT)

5.3.1 „CE-Tests“

5.3.1.1 „CE-Tests“ - Qualitative Methoden in der Molekularbiologie

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

Intra-Assay-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.

Inter-Assay-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.

5.3.1.2 „CE-Tests“: Quantitative Methoden in der Molekularbiologie

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

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit:

Intra-Assay-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.

Inter-Assay-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.

5.3.2 „CE-Tests“: 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 Testkartuschen - exemplarisch seien als Test-/Methoden-Machart das Cepheid Xpert und analog arbeitende Systeme genannt) zum qualitativen / quantitativen Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäure. Grundsätzlich ist darauf zu achten, dass bei diesen Systemen ausreichende Verfahrenskontrollen (z.B. Extraktions- / Aufreinigungssowie 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 Intra-Assay-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, selbstangesezte Puffer) ist der Umfang der Verifizierung von der Laborleitung festzulegen.

Bei qualitativen „CE-Kartuschen-Tests“ (zum Nachweis von ≤ 5 verschiedenen Analyten) wird eine Probe auf das Vorhandensein viraler Nukleinsäure überprüft (negativ / positiv):

Inter-Assay-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“ (zum Nachweis von ≤ 5 verschiedenen Analyten) wird die Methode folgendermaßen überprüft:

Inter-Assay-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 Inter-Assay-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.

5.3.2.1 „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 Testkartuschen 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 - exemplarisch seien als Test-/Methoden-Machart das bioMerieux Film Array und analog arbeitende Systeme genannt).

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 Intra-Assay-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 Verifizierungsumfangs 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 von der Laborleitung festzulegen.

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

Inter-Assay-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.

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

Die im Folgenden beschriebenen Maßnahmen zur Methodenverifizierung gelten für nicht-vollständig-geschlossene / „offene“ molekulargenetische Multiplex-Testsysteme 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 (exemplarisch seien als Test-/Methoden-Machart das Luminex Multiplex Assay und analog arbeitende Systeme genannt).

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 Intra-Assay-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 von der Laborleitung festzulegen.

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

Inter-Assay-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.

5.3.3 „LDT“: Semiquantitative⁷ und qualitative Methoden in der Molekularbiologie

Die im Folgenden beschriebenen Maßnahmen zur Methodvalidierung 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 mitgeführt. Die Ct-Werte sollten zwischen den einzelnen Untersuchungsmaterialien um nicht mehr als ± 3 Ct 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 Erregerzusatz muss für diesen Nachweis 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.

5.3.3.1 „LDT“: Qualitative Analysemethoden in der Molekularbiologie

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

Intra-Assay-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.

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

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

⁷ siehe hierzu auch Abschnitt 2 „Begriffe / Abkürzungen / Definitionen“

Zudem sind - soweit anwendbar und sinnvoll - zu berücksichtigen und zu überprüfen, ob Unterschiede der Empfindlichkeit des Tests bezüglich nahe verwandter Erreger bestehen, z.B. beim Typen-unabhängigen Nachweis von HSV oder Influenza (gleiche Sensitivität gegenüber: HSV-1 u. HSV-2 bzw. Influenza A H1 und H3).

Spezifität:

Sofern möglich und verfügbar:

- Testung von mindestens 20 bekannt negativen Proben
- Testung potentiell kreuzreaktiver Erreger bzw. Analyte (z.B. 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:

(wenn klinisch sinnvoll)

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.

5.3.3.2 „LDT“: Quantitative Analysenmethoden in der Molekularbiologie

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

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit:

Intra-Assay-Präzision: Sofern verfügbar: 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.

Inter-Assay-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 - sofern verfügbar - mindestens 10 bekannt positiven und mindestens 10 bekannt schwach positiven bzw. grenzwertigen Proben.

Spezifität:

Sofern möglich und verfügbar:

- 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, erregerhaltigen 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.

5.4 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:

Sofern machbar, sollten mindestens 10 bereits mit dem alten Test analysierte Patientenproben 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.

5.5 Dokumentation

Alle Analysenergebnisse, die im Rahmen der Methodvalidierung / -verifizierung ermittelt werden, sind zu dokumentieren und auszuwerten. Die dazugehörigen Rohdaten werden an das Formblatt 11.1 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 von der Laborleitung mindestens für die Dauer der Verwendung der Methode (und fünf Jahre darüber hinaus) aufbewahrt. Nach diesem Zeitraum entscheidet die Laborleitung über die weitere Archivierung.

6. Kontinuierliche Überwachung der LDT (nach erstmaliger Nutzung)

Alle LDT-Verfahren werden vor der Inbetriebnahme validiert und in der täglichen Routine durch das Mitführen von regelmäßigen Kontrollen verifiziert. Auch die verwendeten Kontrollen werden validiert. Neu eingeführte Methoden werden im Rahmen der stattfindenden internen Audits besonders betrachtet. Soweit verfügbar wird für die angewendeten Methoden an externen Qualitätsvergleichen teilgenommen. Zur Auswahl stehen dabei

- Ringversuche
- Laborvergleiche (soweit keine Ringversuche angeboten werden)

Die Ergebnisse aus den internen und externen Daten zur Qualitätskontrolle werden kontinuierlich überwacht. Sollten z.B. externe Ringversuche nicht bestanden worden sein, erfolgt eine systematische Ursachenanalyse und es werden ggf. Korrekturmaßnahmen eingeleitet. Die Ergebnisse aus der Überwachung der Produkte werden im Rahmen der jährlichen Managementbewertung durch die Leitung bewertet. Wenn erforderlich werden Maßnahmen festgelegt.

7. Dokumente / mitgeltende Unterlagen

Dokument

8. Anlagen

Nachfolgend sind tabellarisch die jeweiligen Probenanforderungen zur Erfüllung der Leistungsdaten dargestellt. Diese sind auch in einem entsprechenden Validierungsplan zu berücksichtigen.

Die in den Tabellen 1 – 3 verwendeten Begriffe zu Vorgaben der zu analysierenden Untersuchungsmaterialien sind im Sinne dieser VA wie folgt definiert: als „grenzwertig“ gilt das 2- bis 5-fache der unteren Nachweisgrenze des jeweiligen Testsystems (z.B. einer PCR) , als „schwach“ positiv wird eine Probe bewertet, bei der die Menge an Analyt (z.B. zu bestimmender Nukleinsäure) das 20- bis 50-fache der unteren Nachweisgrenze des jeweiligen Testsystems (z.B. einer PCR) beträgt – die Definition kann bei Bedarf durch die Laborleitung begründet angepasst werden.

8.1 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- kenndaten	Probenan- forderungen	CE qualitativ	CE quantitativ	LDT qualitativ	LDT 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 (Intra-Assay)	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 (Inter-Assay)	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	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

nd = nicht durchzuführen / nicht erforderlich, d = Tage, * aus zwei versch. Konz.-Bereichen, ** d.h. zusätzlich zur Intra-Assay-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 die Laborleitung festgelegt, **** ggf. kann durch den Methodenvergleich die Testung der anderen Parameter entfallen bzw. eingeschränkt werden – die Entscheidung hierzu wird durch die Laborleitung getroffen und ist schriftlich zu begründen.

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	LDT qualitativ bzw. (semi)quantitativ
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

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

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	LDT qualitativ	LDT quantitativ	Kartusche ¹ qualitativ	Kartusche ¹ 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, 3 je pot. kreuzreakt. Parameter	soweit möglich bzw. verfügbar, 3 je pot. kreuzreakt. Parameter	nd	nd
Präzision (Intra-Assay)	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 (Inter-Assay)	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 durchzuführen- der Analysen		n = ≥15	n = ≥39	n = ≥87	n = ≥116	n = ≥9	n = ≥15

nd = nicht durchzuführen / nicht erforderlich, d = Tage, * aus zwei versch. Konz.-Bereichen, ** d.h. zusätzlich zur Intra-Assay-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 die Laborleitung festgelegt. **** ggf. kann durch den Methodenvergleich die Testung der anderen Parameter entfallen bzw. eingeschränkt werden – die Entscheidung hierzu wird durch die Laborleitung getroffen und ist schriftlich zu begründen. ***** die Testung kann ggf. mit der Inter-Assay-Prüfung und den dabei verwendeten Proben „kombiniert“ werden. ¹ gilt für Unit-Use Testkartuschen – siehe 5.3.2

Bei qualitativen „CE-„Multiplex-Kartuschen-Tests“ (siehe 5.3.2.1) wird eine Probe auf das Vorhandensein verschiedener viraler und / oder bakterieller Nukleinsäure überprüft (negativ / positiv):

Inter-Assay-Präzision: mindestens je ein bekannt positives und ein bekannt negatives Material werden an zwei verschiedenen Tagen in Einfachbestimmung untersucht. Die Funktionalität der übrigen detektierbaren Analyte wird im Rahmen der routinemäßig mitgeführten internen und externen Qualitätskontrollen überprüft und dokumentiert.

9. Literatur

- ISO/TS 17822-1:2014-12-31: In vitro diagnostic test systems. Qualitative nucleic acid-based in vitro examination procedures for detection and identification of microbial pathogens. General requirements, terms and definitions
- BS ISO 17822-2. In vitro diagnostic test systems. Nucleic acid amplification-based examination procedures for detection and identification of microbial pathogens. Part 2. Laboratory quality practice guide
- Hoffmüller P, Brüggemann M, Eggermann T, Ghoreschi K, Haase D, Hofmann J, Hunfeld KP, Koch K, Meisel C, Michl P, Müller J, Müller C, Rabenau HF, Reinhardt D, Riemenschneider MJ, Sachs UJ, Sack U, Stenzinger A, Streichert T, von Neuhoff N, Weichert W, Weinstock C, Zimmermann S, Spitzenberger F, Ad-hoc-Kommission In-vitro-Diagnostika der AWMF (2021) Stellungnahme der Ad-hoc-Kommission In-vitro-Diagnostika der AWMF zur Umsetzung der Verordnung (EU) 2017/746 (IVDR) im Hinblick auf In-vitro-Diagnostika aus Eigenherstellung. GMS Zeitschrift zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien 2021, Vol. 12, 1-10. ISSN 1869-4241
- Medical Device Coordination Group. MDCG 2020–2016. Guidance on classification rules for in vitro diagnostic medical devices under regulation (EU) 2017/746. November 2020.
- Rabenau HF, Kessler HH (2009) (Abstract) Test validation and accreditation in the clinical virology laboratory. J. Clin. Virol (46 Suppl. 1) S3
- Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, Steinhorst A, Raggam RB, Berger A (2007) Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. J Clin Virol.;40(2):93-8
- Rabenau HF, Kessler HH, Raggam RB, Berger A (2010) Verification and Validation of Virological Laboratory Tests in the Routine Diagnostic Laboratory. In: Jerome KR (ed.): Laboratory Diagnosis of Viral Infections (4th edition) S 1-8. Informa healthcare, New York, London
- Rabenau HF, Kortenbusch M, Berger A, Steinhorst A (2007) Validierung von Untersuchungsverfahren im Bereich der Virusdiagnostik. Lab. Med. 31(2) 41-47
- Reischl U, Rabenau HF (2012) Die MIQ-1 "Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (PCR/NAT)" in der dritten Auflage - was ist neu ? - Beitrag der Qualitätssicherungskommission und der Ständigen Arbeitsgemeinschaft (StAG) "Diagnostische Verfahren" der DGHM. Mikrobiologie 22: 48-52
- Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (Gemäß des Beschlusses des Vorstands der Bundesärztekammer in seiner Sitzung am 18.10.2019). Deutsches Ärzteblatt DOI: 10.3238/arztebl.2019.rili_baek_QS_Labor20192312
- Schoerner C, Abele-Horn M, Albert F, Haase G, Leitritz L, Rabenau HF (2009) Qualitätsmanagement im Medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium (pp 1-86). In: Podbielski A, Herrmann M, Kniehl E, Mauch H, Rüssmann H (Hrsg.), MiQ 30 Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik URBAN & FISCHER München. ISBN-13: 978-3-437-22648-9
- Spitzenberger F, Patel J, Gebuhr I, Kruttwig K, Safi A, Meisel C (2021) Laboratory Developed Tests: Design of a Regulatory Strategy in Compliance with the International State of the Art and the Regulation (EU) 2017/746 (EU IVDR [In Vitro Diagnostic Medical Device Regulation]). Therapeutic Innovation & Regulatory Science <https://doi.org/10.1007/s43441-021-00323-7>
- Verordnung (EU) 2017/746 des europäischen Parlaments und des Rates vom 5. April 2017 über In-vitro-Diagnostika und zur Aufhebung der Richtlinie 98/79/EG und des Beschlusses 2010/227/EU der Kommission
- Wellinghausen N, Abele-Horn M, Donoso Mantke O, Enders M, Gärtner B, Rabenau HF, Reiter-Owona I, Tintelnot K, Weig M, Zeichardt H, Hunfeld KP (2016) MiQ - Infektionsserologische Methoden. Elsevier Verlag

10. Muster-Validierungsplan u.a. zur Entwicklung eines LDT

Nachfolgend ist exemplarisch ein Validierungsplan bzw. ein entsprechendes Formblatt (siehe Pkt. 11.1) aufgeführt. Darin sind alle wesentlichen Aspekte des Validierungsprozesse vor Beginn der Validierung aufzuführen. Der Validierungsplan ist durch den Laborleiter sowie die technischen Mitarbeiter, die die Rohdaten generieren, abzuzeichnen.

Die Institutsleitung entscheidet über die Einführung von Methoden und wählt dabei ggf. auch die Möglichkeit der Herstellung von LDT-Verfahren aus.

Vor der Aufnahme der Validierungstätigkeit wird auf dem gängigen europäischen Markt nach einem kommerziellen CE-gekennzeichneten Produkt gesucht, das für den beabsichtigten Zweck und die verwendete Matrix geeignet ist.

Alle im Labor durchgeführten Verfahren sind in einer Tabelle aufgeführt, in der eine Kategorisierung der Verfahren erfolgt:

- **Kategorie I:** IVD (kommerziell verfügbar), genutzt entsprechend den Vorgaben des Herstellers
- **Kategorie II:** IVD (kommerziell verfügbar), genutzt mit Modifikationen⁸ (daher „LDT-Light“)
- **Kategorie III:** Ein kommerziell verfügbares IVD wäre vorhanden, wird jedoch auf Grund fehlender LDT-Äquivalenz (z.B. Performance Charakteristika des Tests, „Turn-around-Zeit“, Art / Menge des Untersuchungsmaterials / -matrix) nicht eingesetzt.
- **Kategorie IV:** Kein kommerzielles (alternatives) IVD vorhanden

Sollte auf dem Markt kein „vergleichbares“ kommerzielles CE-gekennzeichnetes Produkt für die vorgesehene Zweckbestimmung angeboten werden, ist die Entwicklung eines LDT-Produktes zulässig. Es erfolgt die Klassifizierung des Produktes gemäß den Regeln aus Kapitel V Abschnitt 1 (Art. 47) der IVDR.

Die unter den Punkten 11.2.1 – 11.3.2 dargestellten Musterformblätter enthalten jeweils nachfolgend aufgeführte Grundstruktur:

1. Allgemeines
2. Planung (mit verschiedenen „Unteraspekten“)
3. Messwerte
4. Zusammenfassung der Ergebnisse
5. Bewertung
6. Anlage(n)

⁸ siehe hierzu auch Abschnitt 2 „Begriffe / Abkürzungen / Definitionen“ – LDT-Light

11.2.1 LDT-Test (Kategorie II, III, IV): Methodenvvalidierung – Qualitativ

Methodenvvalidierung – Qualitativ – LDT-Test

1 Allgemeines:

Bezeichnung des Tests: _____

(Bezeichnung in der Konformitätserklärung)

Interne Bezeichnung: _____

Analytnummer (EDV): _____

Gerätebezeichnung: _____

oder: Manuell

Untersuchungsmaterial (Matrix): _____

2 Planung:

Planung durch: _____ am: _____ Unterschrift: _____

Umsetzung bis: _____ Durch: _____ Unterschrift: _____

2.1 Bemerkungen zur Planung (Fragestellung/Zielsetzung) und Angaben zu Publikationen, Referenzlaboren, Vorergebnisse, Besonderheiten, Verweise sowie Begründung bei verkürztem Protokoll (z.B.: CE-Verfahren mit Matrixerweiterung, Nutzung von RUO-Testen)

Angaben zum Skalenniveau des Messverfahrens

Quantitativ (Bestimmung Intra-/ Inter-Assay-Präzision):

Kardinalskala (OD-Werte, (rt-)qPCR, IU-Werte etc.)

Qualitativ (Robustheit, Richtigkeit):

Ordinalskala (Titer, +/++, etc.)

Nominalskala (Immunoblot, positiv / negativ, nachweisbar, etc.)

2.2 Definition der Wertebereiche (ggf. Angabe/Zuordnung im Befund):

Ggf. Angabe im Befund					
hoch positiv : _____	<input type="radio"/>				
positiv : _____	<input type="radio"/>				
schwach positiv : _____	<input type="radio"/>				
grenzwertig : _____	<input type="radio"/>				
negativ : _____	<input type="radio"/>				

Ggf. weitere Angaben zum Wertebereich:

(Wertebereiche können sein: Titer, Messbereiche (z.B. 500 – 1000 IE), Bandenstärke, Anzahl der Banden (WB), etc.)

2.7 Linearität*

(*i.d.R. bei molekularbiologische Verfahren (NAT) mit qualitativer Angabe im Befund)

Entfällt

Sofern erforderlich:

Probenbezeichnung 1: _____ ggf. Bestellnummer: _____

Konzentration Ausgangsprobe: _____ Einheit: _____

Verdünnungsstufen: # _____ (mind. 4) Verdünnungsfaktor: _____ (i.d.R.: 1:10 oder 1:5)

Probenbezeichnung 2: _____ ggf. Bestellnummer: _____

Konzentration Ausgangsprobe: _____ Einheit: _____

Verdünnungsstufen: # _____ (mind. 4) Verdünnungsfaktor: _____ (i.d.R.: 1:10 oder 1:5)

3 Messwerte:

- a.) Sensitivität und Spezifität siehe 6.1 (Blatt 1 bis _____) siehe Anlage
 b.) Intra- und Inter-Assay-Präzision siehe 4.2
 c.) Linearität siehe 4.3

3.1 Bemerkungen zur Messung (Änderungen, Probleme, Software, etc.):

4. Zusammenfassung der Ergebnisse:

4.1 Sensitivität und Spezifität

siehe Tabelle 1 siehe Anlage(n)

Tabelle 1: Zusammenfassung der Messungen zur Sensitivität und Spezifität

IST	SOLL		
	(Stark) positiv # _____	Schwach positiv # _____	Negativ # _____
(Hoch) positiv			
Schwach positiv			
negativ			

= Anzahl der Untersuchten Proben.

4.2 Intra- und Inter-Assay-Präzision

siehe Tabelle 2 siehe Anlage

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse der Intra- und Inter-Assay-Präzision

Probenbezeichnung	Messung 1 (3x)			Messung 2	Messung 3
1:					
2:					
3:					

4.3 Linearität

O siehe Tabelle 3 O siehe Anlage

Tabelle 3: Bestimmung der Linearität

Probenbez.:								
Messreihe	V1	V2	V3	V4	_____	_____	_____	_____
Tag 1-1								
Tag 1-2								
Tag 2-1								
Tag 2-2								
Probenbez.:								
Messreihe	V1	V2	V3	V4	_____	_____	_____	_____
Tag 1-1								
Tag 1-2								
Tag 2-1								
Tag 2-2								

5. Bewertung:

5.1 Sensitivität und Spezifität:

Tabelle 4: Bewertung der Sensitivität und Spezifität:

	Neues Verfahren (in Prozent)	Zielsetzung* (in Prozent)	Bewertung
Sensitivität		(>95)	
Spezifität		(>98)	

* Angaben in Klammern geben die laborinternen Vorgaben wieder. Es sind ggf. RiliBÄK Vorgaben und Herstellerangaben zu berücksichtigen. Angabe erfolgt hier vor der Klammer.

5.2 Intra- und Inter-Assay-Präzision bzw. Richtigkeit / Robustheit

Tabelle 5: Bewertung Intra- und Inter-Assay-Präzision:

Proben- bezeichnung	Intra-Assay (in Prozent)	Zielsetzung* (in Prozent)	Inter-Assay (in Prozent)	Zielsetzung (in Prozent)	Bewertung
1:		(<15)		(<25)	
2:		(<15)		(<25)	
3:		(<15)		(<25)	

* Angaben in Klammern geben die laborinternen Vorgaben für quantitative Messverfahren wieder. Es sind ggf. RiliBÄK Vorgaben und Herstellerangaben zu berücksichtigen. Angabe erfolgt hier vor der Klammer. Bei rein qualitativen Messverfahren (IB, Titer) werden die Ergebnisse in Bezug auf Wiederholgenauigkeit (#IST/#Soll *100) in Prozent angegeben. Die laborinternen Vorgaben sind hier 100% – wobei Abweichungen von ± einer Titerstufe akzeptiert/als Zielwert erreicht eingestuft werden.

5.3 Linearität

Tabelle 5: Bestimmung der Linearität

ggf. Grafische Darstellung – O siehe Anlage

Probenbezeichnung	Regressionsgerade r-Wert	Zielwert	Linearer Bereich	Zielwert	Bewertung
		>0,95		>3 Verd. Stufen	
		>0,95		>3 Verd. Stufen	

5.4 Bemerkungen zur Bewertung:

Freigabe kann zugestimmt werden: Ja Nein (ggf. Folgemaßnahmen unter 5.4)

Datum: _____ Unterschrift: _____

6. Anlage(n) zur Validierung von Test: _____

6.1 Sensitivität und Spezifität (exemplarisch):

Messzeitraum: _____ Durchgeführt von: _____

Ggf. Chargenbezeichnung: _____ Blatt _____ von _____

Lfd.- Nr.:	Proben- bezeichnung	Gemessen	Erwartungswert*	Lfd.- Nr.:	Proben- bezeichnung	Gemessen	Erwartungswert*
1				12			
2				13			
3				14			
4				15			
5				16			
6				17			
7				___			
8				___			
9				___			
10				___			
11				___			

*Erwartungswert erst nach erfolgter Messung eingetragen.

11.2.2 LDT-Test (Kategorie II, III, IV): **Methodenvalidierung – Quantitativ**

Methodenvalidierung - Quantitativ

1. Allgemeines:

Bezeichnung des Tests: _____

(Bezeichnung in der Konformitätserklärung)

Interne Bezeichnung: _____

Analytnummer (EDV): _____

Gerätebezeichnung: _____

oder: Manuell

Untersuchungsmaterial (Matrix): _____

2. Planung:

Planung durch: _____ am: _____ Unterschrift: _____

Umsetzung bis: _____ Durch: _____ Unterschrift: _____

2.1 Bemerkungen zur Planung (Fragestellung/Zielsetzung) und Angaben zu Publikationen, Referenzlaboren, Vorergebnisse, Besonderheiten, Verweise sowie Begründung bei verkürztem Protokoll (z.B.: CE-Verfahren mit Matrixerweiterung, Nutzung von RUO-Testen)

2.2 Definition der Wertebereiche

a) Interne Vorgaben (Zweckbestimmung/Zielsetzung) oder Herstellerangaben (Modifikation):

Einheit: _____ Nachweisgrenze (LOD): _____

Untere und obere Bestimmungsgrenze (LOQ): < _____ > _____

Linearer Messbereich: von: _____ bis: _____

negativ nicht detektierbar unter Nachweisgrenze (ungr) _____

b) Intern festgelegte Wertebereiche

hoch positiv: _____ positiv: _____ schwach positiv / grenzwertig: _____

ggf. fraglich positiv: _____ ggf. negativ / nicht detektierbar: _____

Ggf. weitere Angaben zum Wertebereich:

2.3 Referenz- / klinische Entscheidungswerte:

2.4 Potentiell kreuzreaktive Parameter / Proben

Auflistung potenzieller, kreuzreaktiver Parameter (mind. 3) und der zu analysierenden / berücksichtigenden Wertebereiche. Eine Auflistung muss nur erfolgen, wenn die entsprechenden Proben auch (extern/intern) verfügbar sind.

Bezeichnung	Wertebereiche	Bezeichnung	Wertebereiche	Bezeichnung	Wertebereiche

2.5 Sensitivität / Spezifität mittels:

externer Proben*

*Ringversuchsproben, Qualitätskontrollen (anderer Hersteller), Referenz-Institut etc., externes Labor

Vergleichsmessung mit den Erwartungswerten:

#_____hoch positiv / #_____ positiv	(i.d.R mind. 10)
#_____schwach positiv / grenzwertig	(i.d.R. mind. 10)
#_____negativ	(i.d.R. mind. 20)
#_____negativ (Kreuzreaktion)	(i.d.R. mind. 3)

interner Proben* (ergänzend oder alternativ)

*Frühere Proben, Qualitätskontrollen

Vergleichsmessung mit den Erwartungswerten:

#_____hoch positiv / #_____ positiv	(i.d.R mind. 10)
#_____schwach positiv/ grenzwertig	(i.d.R. mind. 10)
#_____negativ	(i.d.R. mind. 20)
#_____negativ (Kreuzreaktion)	(i.d.R. mind. 3)

Bemerkungen bzw. Vorgaben zur Probenauswahl:

2.6 Intra- / Inter-Assay-Präzision bzw. Robustheit / Richtigkeit:

I.d.R. 3 Probensets mit 4 Proben in verschiedenen Wertebereichen. Zunächst in Dreifachbestimmung (Messreihe 1) und nachfolgend in Einfachbestimmung in 2 unabhängigen Messreihen-/tagen.

<input type="radio"/> Probe 1: Oberer linearer Messbereich	ggf. Wertebereich:_____
<input type="radio"/> Probe 2: Mittlerer linearer Messbereich	ggf. Wertebereich:_____
<input type="radio"/> Probe 3: Unterer linearer Messbereich	ggf. Wertebereich:_____
<input type="radio"/> Probe 4: unter Nachweisgrenze/negativ	ggf. Wertebereich*:_____

* Angabe im Regelfall nur bei quantitativen Werten (z.B.: qPCR)

2.7 Linearität

Probenbezeichnung 1:_____ ggf. Bestellnummer: _____

Konzentration Ausgangsprobe: _____ Einheit:_____

Verdünnungsstufen: #_____ (mind. 4) Verdünnungsfaktor:_____ (i.d.R.: 1:10 oder 1:5)

Probenbezeichnung 2:_____ ggf. Bestellnummer: _____

Konzentration Ausgangsprobe: _____ Einheit:_____

Verdünnungsstufen: #_____ (mind. 4) Verdünnungsfaktor:_____ (i.d.R.: 1:10 oder 1:5)

3. Messwerte:

- | | | |
|--------------------------------------|---|------------------------------------|
| a.) Sensitivität und Spezifität | <input type="radio"/> siehe 6.1 (Blatt 1 bis _____) | <input type="radio"/> siehe Anlage |
| b.) Intra- und Inter-Assay-Präzision | <input type="radio"/> siehe 4.2 | |
| c.) Linearität | <input type="radio"/> siehe 4.3 | |

3.1 Bemerkungen zur Messung (Änderungen, Probleme, Software, etc.):

4. Zusammenfassung der Ergebnisse:

4.1 Sensitivität und Spezifität

siehe Tabelle 1 siehe Anlage

Tabelle 1: Zusammenfassung der Messungen zur Sensitivität und Spezifität.

IST	SOLL			
		(Stark) positiv #_____	Schwach positiv #_____	Negativ #_____
	(Hoch) positiv			
	Schwach positiv			
	negativ			

= Anzahl der Untersuchten Proben.

4.2 Intra- und Inter-Assay-Präzision

siehe Tabelle 2 siehe Anlage

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse der Intra- und Inter-Assay-Präzision

1. Probenset	Messung 1 (3x)			Messung 2	Messung 3
1:					
2:					
3:					
4:					
2. Probenset	Messung 1 (3x)			Messung 2	Messung 3
1:					
2:					
3:					
4:					
3. Probenset	Messung 1 (3x)			Messung 2	Messung 3
1:					
2:					
3:					
4:					

4.3 Linearität

O siehe Tabelle 3

O siehe Anlage

Tabelle 3: Bestimmung der Linearität

Probenbez.:								
Messreihe	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8
Tag 1-1								
Tag 1-2								
Tag 2-1								
Tag 2-2								
Probenbez.:								
Messreihe	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8
Tag 1-1								
Tag 1-2								
Tag 2-1								
Tag 2-2								

5. Bewertung:

5.1 Sensitivität und Spezifität:

Tabelle 4: Bewertung der Sensitivität und Spezifität:

	Neues Verfahren	Zielsetzung*	Bewertung
Sensitivität		()	
Spezifität		()	

* Laborinterne Zielvorgaben für quantitative Messverfahren (siehe VA-Methodenvalidierung). Ggf.: Herstellerangaben in der Klammer angeben (z.B. bei Testmodifikationen, RUO)

5.2 Intra- und Inter-Assay-Präzision

Tabelle 5: Bewertung Intra- und Inter-Assay-Präzision:

Probenbezeichnung	Intra-Assay	Zielsetzung*	Inter-Assay	Zielsetzung*	Bewertung
1:		()		()	
2:		()		()	
3:		()		()	
4**:		()		()	

* Angaben zu RiliBÄK-Zielvorgaben bzw. wenn nicht vorhanden, laborinternen Zielkriterien für quantitative Messverfahren (siehe VA-Methodenvalidierung). Ggf.: Herstellerangaben in der Klammer angeben (z.B. bei Testmodifikationen, RUO). ** Wenn bei negativen Proben keine Werte vorliegen (z.B. (rt-)qPCR), werden die Ergebnisse in Bezug auf Wiederholgenauigkeit (#IST/#Soll *100) in Prozent angegeben. Die laborinternen Vorgaben sind hier i.d.R. 100%

5.3 Linearität

Tabelle 5: Bestimmung der Linearität

Grafische Darstellung – siehe Anlage

Probenbezeichnung	Regressionsgerade r-Wert	Zielwert	Linearer Bereich	Zielwert	Bewertung
		>0,95		>4 Verd. Stufen	
		>0,95		>4 Verd. Stufen	

5.4 Bemerkungen zur Bewertung:

Freigabe kann zugestimmt werden: Ja Nein (ggf. Folgemaßnahmen unter 5.3)

Datum: _____

Unterschrift: _____

6. Anlage(n) zur Validierung von Test: _____

6.1 Sensitivität und Spezifität (exemplarisch):

Messzeitraum: _____

Durchgeführt von: _____

Ggf. Chargenbezeichnung: _____

Blatt ____ von ____

Lfd.- Nr.:	Proben- bezeichnung	Gemessen	Erwartungswert*	Lfd.- Nr.:	Proben- bezeichnung	Gemessen	Erwartungswert*
1				12			
2				13			
3				14			
4				15			
5				16			
6				___			
7				___			
8				___			
9				___			
10				___			
11				___			

*Erwartungswert erst nach erfolgter Messung eingetragen.

11.3.1 CE-Test (Kategorie I): Methodenverifizierung – Qualitativ

Methodenverifizierung – Qualitativ – CE-Test

1 Allgemeines:

Bezeichnung des Tests: _____

(Bezeichnung in der Konformitätserklärung)

Interne Bezeichnung: _____

Analyt Nummer (EDV): _____

Gerätebezeichnung: _____

oder: Manuell

Untersuchungsmaterial (Matrix): _____

2 Planung:

Planung durch: _____ am: _____ Unterschrift: _____

Umsetzung bis: _____ Durch: _____ Unterschrift: _____

2.1 Bemerkungen zur Planung (Fragestellung/Zielsetzung) und Angaben zu Publikationen, Referenzlaboren, Vorergebnisse, Besonderheiten, Verweise sowie Begründung bei verkürztem Protokoll

Angaben zum Skalenniveau des Messverfahrens

Quantitativ (Bestimmung Intra-/ Inter-Assay-Präzision):

Kardinalskala (OD-Werte, (rt-)qPCR, IU-Werte etc.)

Qualitativ (Robustheit, Richtigkeit):

Ordinalskala (Titer, +/++, etc.)

Nominalskala (Immunoblot, positiv / negativ, nachweisbar, etc.)

2.2 Definition der Wertebereiche (ggf. Angabe/Zuordnung im Befund):

Ggf. Angabe im Befund					
-----------------------	--	--	--	--	--

hoch positiv	: _____	<input type="radio"/>				
positiv	: _____	<input type="radio"/>				
schwach positiv	: _____	<input type="radio"/>				
grenzwertig	: _____	<input type="radio"/>				
negativ	: _____	<input type="radio"/>				

Ggf. weitere Angaben zum Wertebereich:

Wertebereiche können sein: Titer, Messbereiche (500 – 1000 IE), Bandenstärke, Anzahl der Banden (WB), etc.

2.3 Referenz- / klinische Entscheidungswerte:

11.3.2 CE-Test (Kategorie I): Methodenverifizierung – Quantitativ

Methodenverifizierung – Quantitativ – CE-Test

1 Allgemeines:

Bezeichnung des Tests: _____

(Bezeichnung in der Konformitätserklärung)

Interne Bezeichnung: _____

Analytnummer (EDV): _____

Gerätebezeichnung: _____

oder: Manuell

Untersuchungsmaterial (Matrix): _____

2 Planung:

Planung durch: _____ am: _____ Unterschrift: _____

Umsetzung bis: _____ Durch: _____ Unterschrift: _____

2.1 Bemerkungen zur Planung (Fragestellung/Zielsetzung) und Angaben zu Publikationen, Referenzlaboren, Vorergebnisse, Besonderheiten, Verweise sowie Begründung bei verkürztem Protokoll

2.2 Definition der Wertebereiche

a) Interne Vorgaben (Zweckbestimmung/Zielsetzung) oder Herstellerangaben:

Einheit: _____ Nachweisgrenze (LOD): _____

Untere und obere Bestimmungsgrenze (LOQ): < _____ > _____

Linearer Messbereich: von: _____ bis: _____

negativ nicht detektierbar unter Nachweisgrenze (ungr) _____

b) Intern festgelegte Wertebereiche

hoch positiv: _____ positiv: _____ schwach positiv/ grenzwertig: _____

ggf. fraglich positiv: _____ ggf. negativ/ nicht detektierbar: _____

Ggf. weitere Angaben zum Wertebereich:

2.3. Referenz-/klinische Entscheidungswerte:

2.4 Intra-/ Inter-Assay-Präzision bzw. Robustheit/ Richtigkeit:

I.d.R. 3 Probensets mit 3 Proben in verschiedenen Wertebereichen. Zunächst in Dreifachbestimmung (Messreihe 1) und nachfolgend in Einfachbestimmung in 2 unabhängigen Messreihen-/tagen.

- Probe 1: Oberer linearer Messbereich ggf. Wertebereich: _____
- Probe 3: Unterer linearer Messbereich ggf. Wertebereich: _____
- Probe 3: negativ ggf. Wertebereich*: _____

* Angabe im Regelfall nur bei quantitativen Werten (z.B.: qPCR)

2.7 Linearität*

(I.d.R. nur bei molekularbiologischen (NAT) Verfahren)

Entfällt

Probenbezeichnung: _____ ggf. Bestellnummer: _____

Konzentration Ausgangsprobe: _____ Einheit: _____

Verdünnungsstufen: # _____ (mind. 3) Verdünnungsfaktor: _____ (i.d.R.: 1:10 oder 1:5)

3. Messwerte:

- a.) Intra- und Inter-Assay-Präzision siehe 4.1
- b.) Linearität siehe 4.2

3.1 Bemerkungen zur Messung (Änderungen, Probleme, Software, etc.):

4. Zusammenfassung der Ergebnisse:

4.1 Intra- und Inter-Assay-Präzision

siehe Tabelle 2 siehe Anlage

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse der Intra- und Inter-Assay-Präzision

1. Probenstet	Messung 1 (3x)			Messung 2	Messung 3
1:					
2:					
3:					
2. Probenstet	Messung 1 (3x)			Messung 2	Messung 3
1:					
2:					
3:					
3. Probenstet	Messung 1 (3x)			Messung 2	Messung 3
1:					
2:					
3:					

4.2 Linearität

O siehe Tabelle 3 O siehe Anlage

Tabelle 3: Bestimmung der Linearität

Probenbez.:								
Messreihe	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8
Tag 1-1								
Tag 1-2								

5. Bewertung:

5.1 Intra- und Inter-Assay-Präzision

Tabelle 5: Bewertung Intra- und Inter-Assay-Präzision:

Probenbezeichnung	Intra-Assay	Zielsetzung*	Inter-Assay	Zielsetzung*	Bewertung
1:		()		()	
2:		()		()	
3**:		()		()	

* Angaben zu RiliBÄK-Zielvorgaben bzw. wenn nicht vorhanden, laborinternen Zielkriterien für quantitative Messverfahren (siehe VAW-Methodenvalidierung). Ggf.: Herstellerangaben in der Klammer angeben (z.B. bei Testmodifikationen). ** Wenn bei negativen Proben keine Werte vorliegen (z.B. (rt-)qPCR) erfolgt, werden die Ergebnisse in Bezug auf Wiederholgenauigkeit (#IST/#Soll *100) in Prozent angegeben. Die laborinternen Vorgaben sind hier 100%

5.2 Linearität

Tabelle 5: Bestimmung der Linearität

Grafische Darstellung – O siehe Anlage

Probenbezeichnung	Regressionsgerade r-Wert	Zielwert	Linearer Bereich	Zielwert	Bewertung
		>0,95		>3 Verd. Stufen	

5.3 Bemerkungen zur Bewertung:

Freigabe kann zugestimmt werden: O Ja O Nein (ggf. Folgemaßnahmen unter 5.3)

Datum: _____ Unterschrift: _____

Ggf. zusätzlich

6. Anlage(n) zur Verifizierung von Test: _____

6.1 Sensitivität und Spezifität (exemplarisch):

11.4 Muster-Erklärung u.a. zu IVD aus Eigenherstellung und zur Umsetzung allgemeiner Anforderungen

Entsprechende Erklärungen zur Konformität und zur "Umsetzung allgemeiner Anforderungen", sowie eine Verfahrensanweisung zum Risikomanagement und eine Checkliste zur Analogie zwischen IVDR, Anhang I und ISO 15189 wurden von anderen AWMF-Arbeitsgruppen erstellt und werden separat veröffentlicht.