

Infektiologie u. Mikrobiologie
(Schwerpunkt Virologie)

Redaktion: Bernard Weber

Validierung von Untersuchungsverfahren im Bereich der Virusdiagnostik

Validation of virus diagnostics tests

**Holger F. Rabenau^{1,*}, Marhild Kortenbusch¹,
Annemarie Berger¹ und Andreas Steinhorst²**

¹ Institut für Medizinische Virologie (Direktor: Prof. Dr. H. W. Doerr), Klinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt, Deutschland

² DACH Deutsche Akkreditierungsstelle Chemie, Frankfurt, Deutschland

Zusammenfassung

In den letzten zwei Jahrzehnten hat die Diagnostik viraler Infektionen wesentlich an Bedeutung gewonnen. Neben kostengünstigen Untersuchungen ist es insbesondere für den Arzt und die Patienten wichtig, schnelle und richtige Untersuchungsergebnisse von den Laboratorien zu erhalten. Die Richtigkeit der Untersuchungsergebnisse hängt von verschiedenen Faktoren ab. Besonders wichtig ist die Eignung und Leistungsfähigkeit des benutzten Tests bzw. Untersuchungsverfahrens.

Gemäß der DIN EN ISO 15189 „Medizinische Laboratorien – besondere Anforderungen an die Qualität und Kompetenz“ und der In-vitro-Diagnostika-Richtlinie dürfen nur Tests bzw. Untersuchungsverfahren eingesetzt werden, deren Eignung und Leistungsfähigkeit ermittelt und nachgewiesen wurde.

Die Darlegung der Eignung und Leistungsfähigkeit – die so genannte Validierung – wird allerdings in beiden Dokumenten nur in allgemeiner Form angesprochen. Für den Bereich der Virusdiagnostik wurde daher ein Leitfaden erstellt, in dem die Mindestanforderungen an die Validierung konkretisiert werden. Dabei wird zwischen kommerziellen CE-gekennzeichneten Tests und In-house-Tests sowie zwischen den verschiedenen in der Virusdiagnostik zur Anwendung kommenden Methoden unterschieden.

Schlüsselwörter: Diagnostik; DIN EN ISO 15189; IvD-Richtlinie; Validierung; Verifizierung; Virologie.

*Korrespondenz: Prof. Dr. Holger F. Rabenau, Institut für Medizinische Virologie, Klinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt, Paul-Ehrlich-Str. 40, 60596 Frankfurt, Deutschland
Tel.: +49 (069) 6301-5312
Fax: +49 (069) 6301-83061
E-mail: rabenau@em.uni-frankfurt.de

Abstract

During the last two decades the laboratory diagnostics of virus infections has achieved essential importance. In addition to low-cost examinations, it is important for the doctor and patient to obtain fast and correct laboratory results. The correctness of the results depends on different factors. The suitability and efficiency of the test and/or examination procedure under consideration are of particular importance.

According to the ISO 15189 “Medical laboratories – special requirements for quality and competence” and the guideline for in vitro diagnostic medical devices (IvD Directive) only tests and/or examination procedures may be used for which suitability and capability could be demonstrated. Requirements for suitability and efficiency or the so-called validation is only generally addressed in both documents.

Therefore, a guideline for virus diagnostics has been developed where the requirements for validation are described in detail. The guideline distinguishes between the validation of commercial tests, in-house tests, and the different examination methods used in virus diagnostics.

Keywords: diagnostics; EN ISO 15189; IvD-Directive.; validation; verification; virology.

Grundlagen der Virusdiagnostik

Das Spektrum der Methodik, das in der Virusdiagnostik zur Verfügung steht, ist in den letzten Jahren deutlich gewachsen. Die Laboratoriumsdiagnostik viral bedingter Erkrankungen folgt zwei wesentlichen Prinzipien:

- Beim indirekten Virusnachweis durch die Immunantwort des Wirts, werden virusspezifische Antikörper unterschiedlicher Immunglobulinklassen (IgG, IgM, IgA) und -qualitäten (z.B. neutralisations-kompetente Antikörper) nachgewiesen. Damit ist es auch möglich, Aussagen über den Immunstatus und -schutz von Patienten zu treffen. Für den indirekten Nachweis steht eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden inkl. Immunfluoreszenztest, ELISA, CLIA, MEIA, Western Blot und Neutralisationstest zur Verfügung.

- Dem gegenüber steht der direkte Nachweis von Viren oder viraler Komponenten. Diesen Verfahren ist vor allem in der akuten Phase der Erkrankung der Vorzug zu geben [1]. Der direkte Virusnachweis erfolgt z.B. mittels Isolierung und Anzüchtung von Viren auf Zellkulturen oder in Versuchstieren, mittels Antigennachweis bzw. Nachweis des viralen Genoms oder durch Begutachtung der morphologischen Strukturen mittels Transmissionselektronenmikroskopie.

In den letzten zehn Jahren hat die molekularbiologische Diagnostik am stärksten expandiert und die Möglichkeiten der Virusdiagnostik deutlich erweitert [2]. So kann in der Frühphase der Infektion, wenn teilweise nur geringere Mengen viralen Antigens vorhanden sind und noch keine Antikörper gebildet wurden bzw. aufgrund einer Immunsuppression gebildet werden konnten, virale Nukleinsäure nachgewiesen werden. Weiterhin können intrauterine und/oder (peri)natale Infektionen frühzeitig erfasst und durch die quantitative Nukleinsäurediagnostik eine verbesserte Therapiekontrolle im Sinne eines Therapiemonitorings ermöglicht werden. Das heute am weitesten entwickelte Verfahren ist die Nukleinsäureamplifikation. Dabei sind zwei wesentliche Prinzipien zu unterscheiden: Verfahren mit Signalamplifikation, z.B. mittels branched DNA, „hybrid capture“ und solche mit Zielsequenz-Amplifikation, z.B. mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Reverse-Transkriptions-PCR, Ligase-Kettenreaktion, Nukleinsäuresequenzbasierte Amplifikation (NASBA, TMA), selbstunterhaltende Sequenzreplikation (3SR) und „real time“-PCR-Methoden. Die Sensitivität, der dynamische Messbereich und auch die Geschwindigkeit dieser Verfahren wurden zwischenzeitlich deutlich verbessert. Dennoch sind molekularbiologisch-diagnostische Tests in der Routineanwendung weiterhin als relativ neue Verfahren zu bezeichnen und der Prozess der Qualitätssicherung und Standardisierung birgt Verbesserungspotential. Bislang ist nur eine begrenzte Anzahl internationaler Standards und Referenzmaterialien zur Genomquantifizierung verfügbar.

Eine hochwertige Diagnostik hängt von zahlreichen Faktoren ab. Dazu gehören die Wahl des geeigneten Untersuchungsmaterials, der richtige Zeitpunkt der Probenentnahme (Infektionszeitpunkt) sowie Schnelligkeit und Umgebungsbedingungen des Transportes, aber auch die Bewertung der Ergebnisse im Kontext mit der klinischen Symptomatik und der eingesetzten Methode und deren Zuverlässigkeit [3].

Validierung der Untersuchungsverfahren

Die grundsätzliche Eignung eines Verfahrens für die Durchführung eines Tests, muss noch nicht bedeuten, dass es auch in jedem Fall richtig durchgeführt wird und valide Ergebnisse ergibt. Daher fordert die DIN EN ISO 15189 [4], dass jedes Untersuchungsverfahren validiert

sein und die richtige Anwendung dargelegt werden muss. In welchem Umfang das zu erfolgen hat, hängt im Wesentlichen davon ab, ob es sich um einen CE-gekennzeichneten, an anderer Stelle entwickelten und kommerziell erhältlichen oder um einen selbst entwickelten oder auf der Basis externer wissenschaftlicher Arbeiten etablierten (In-house) Test handelt (Abbildung 1). Erst wenn die Methode validiert und vom Labor freigegeben wurde, dürfen Patientenergebnisse damit ermittelt und weitergegeben werden. Bei CE-gekennzeichneten Tests wurde die Validierung der Methode vom Hersteller durchgeführt und die wesentlichen Validierungsdaten der Methode liegen vor. Der Anwender muss jedoch stets sicherstellen, dass die Leistungsdaten, z.B. Präzision und Richtigkeit, im durchführenden Laboratorium nachweisbar erreicht werden („Verifizierung“). Demgegenüber ist bei In-house-Tests das Labor für den Nachweis der Eignung der Methode in der entsprechenden Anwendung selbst verantwortlich („Validierung“).

Zu überprüfen sind in diesem Fall beispielsweise Präzision, Richtigkeit und Linearität bei quantitativen Testsystemen bzw. die Nachweisgrenze bei qualitativen Testsystemen (Abbildungen 1 und 2). Die Präzision als Maß für den Grad der Übereinstimmung zwischen den einzelnen unabhängigen Messergebnissen umfasst vor allem die Reproduzierbarkeit (Wiederholgenauigkeit eines Labortests; Intraassay- und Interassay-Präzision). Die Sensitivität ist ein Maß für die Anzahl richtig positiver Ergebnisse verglichen mit der Gesamtzahl der positiven Ergebnisse, während die Spezifität ein Maß für die Anzahl richtig negativer Ergebnisse ist, verglichen mit der Gesamtzahl der negativen Ergebnisse. Eine hohe Spezifität sichert somit den Ausschluss falsch positiver Ergebnisse. Wurde der zu untersuchende Parameter bisher bereits mit einer anderen Methode bestimmt, ist ein Testvergleich durchzuführen und die Ergebnisse auf Übereinstimmung zu prüfen. Mit diesem Methodenvergleich werden Messungen der Richtigkeit/Korrelation der quantitativen Einzelergebnisse aus zwei verschiedenen Tests zum Nachweis identischer Analyte vorgenommen. Ein klassisches Verfahren hierfür ist die Korrelationsanalyse (Abbildung 2). Weiterhin müssen neue Ausführungen von Untersuchungskits mit wesentlichen Veränderungen auf ihre Leistungsfähigkeit und Eignung erneut geprüft werden. Bei der Validierung/Verifizierung sind auch Schnelltests zu berücksichtigen. So müssen beispielsweise auch HIV- (Rapid Test Device/RTD) oder Influenza-Antigen-Schnelltests (POCT, Point of Care Testing) verifiziert werden.

Mit einer laborinternen Vorgabe zu Art und Umfang der notwendigen Validierung/Verifizierung sollen standardisierte Vorgehensweisen gesichert werden. Das kann in Form einer Verfahrensanweisung erfolgen, deren Ziel es sein sollte, Maßnahmen zur Methodvalidierung in der Virologie inkl. kommerziell hergestellter In-vitro-Diagnostika (IvD) und In-house-hergestellter IvD zu beschreiben. Eine solche Verfahrensanweisung findet häufig ihre Limitierungen, die u.a. die Herstellung der IvD, aber auch

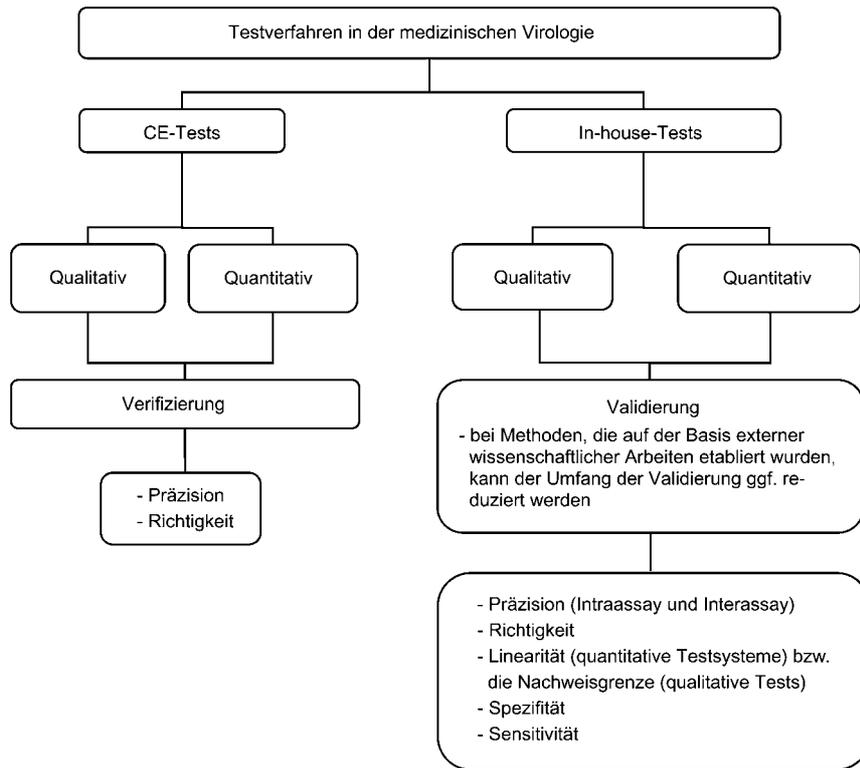


Abbildung 1 Erfordernisse an die Validierung/Verifizierung von Untersuchungsverfahren in der virologischen Laboratoriumsdiagnostik (modifizierter Auszug aus der Verfahrensanweisung „Validierung von Methoden in der Virologie“ des Institutes für Medizinische Virologie, Frankfurt/Main).

Maßnahmen zur Qualitätssicherung im Sinne einer Chargenkontrolle, Haltbarkeit, Lagerungsbedingungen betreffen. In-vitro-Diagnostika gemäß Anhang 2, Liste A der Richtlinie 98/79/ (u. a. Humanes Immundefizienz Virus 1

und 2, HTLV 1 und 2, Hepatitis B Virus, Hepatitis C Virus, Hepatitis D Virus) ist besondere Aufmerksamkeit zu schenken. Für solche Tests/Produkte existieren die so genannten Gemeinsamen Technischen Spezifikationen

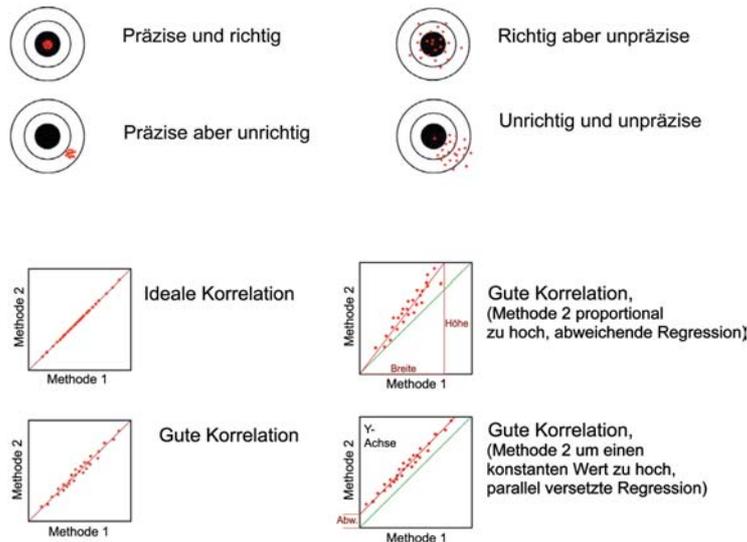


Abbildung 2 Mindestanforderung bei der Verifizierung von CE-gekennzeichneten Tests ist die Überprüfung von Präzision und Richtigkeit sowie ein Methodenvergleich zur Korrelation der (quantitativen) Einzelergebnisse aus zwei verschiedenen Tests zum Nachweis desselben Analyten.

Vereinfachte Darstellung der Zusammenhänge von Präzision und Richtigkeit. Modifiziert nach: http://www.med4you.at/laborbefunde/allgemeines/lbef_qualitaet.htm#Pr.

[5–7], die Vorgaben zur Anzahl und Art der zu testenden Proben definieren. Das Paul-Ehrlich-Institut stellt dazu weitere Detailanforderungen zur Verfügung (<http://www.pei.de/>).

In vielen Laboratorien zeigen sich zum Thema Validierung/Verifizierung Probleme und Defizite, da keine klaren Vorgaben zum Umfang der Testung für Validierung/Verifizierung bestehen und keine ausreichenden Validierungsdaten und deren bewertende Interpretation vorliegen. Häufig fehlen Daten zur Intra- und Interassay-Präzision und die Reproduzierbarkeit kann nicht belegt werden. Methodenvergleiche sind zu fordern sowie bei In-house-PCR Angaben zum Ausschluss von Kreuzreaktivitäten mit verwandten Viren.

Um diesen Defiziten entgegen zu wirken, wurde ein Leitfaden für den Validierungs-/Verifizierungsumfang erarbeitet und in den gemeinsamen Diagnostikausschuss der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) und der Gesellschaft für Virologie (GfV) eingebracht. Der Leitfaden wurde vom Ausschuss verabschiedet und als offizielles Dokument auf der Homepage der Fachgesellschaften veröffentlicht. Wesentliche Elemente daraus werden nachfolgend zusammenfassend dargestellt. Differenziert wird dabei nach CE-gekennzeichneten und In-house-Tests sowie nach den verschiedenen Untersuchungsmethoden wie Infektionsserologie, Virusisolierung auf Zellkulturen und molekularbiologische Virusdiagnostik.

Verifizierung von CE-gekennzeichneten Tests in der Infektionsserologie

Als Mindestanforderung an den Verifizierungsumfang CE-gekennzeichneter, semiquantitativer und qualitativer Methoden in der Infektionsserologie gilt, dass für die Überprüfung der Intraassay-Präzision mindestens je eine bekannt positive, eine bekannt negative und eine schwach positive bzw. grenzwertige Probe am ersten Tag in Dreifachbestimmung zu untersuchen sind. Die Matrix dieser Kontrollen sollte dabei dem Patientenmaterial entsprechen. Für die Interassay-Präzision sind die gleichen Proben an zwei weiteren Tagen in Einfachbestimmung zu testen. Bei quantitativen, serologischen, CE-gekennzeichneten Tests sind für die Intraassay-Präzision mindestens zehn verschiedene Proben aus Referenzmaterial, Patientenproben oder Poolserum zu verwenden. Drei negative, drei schwach, drei höher und eine stark positive Probe(n) sind am ersten Tag in Dreifachbestimmung zu untersuchen. Für die Interassay-Präzision wird je eine der am ersten Tag getesteten Proben aus den unterschiedlichen Bereichen an zwei weiteren Tagen in Einfachbestimmung analysiert (vgl. Tabelle 1).

Wurde der neue Testparameter bereits vorher mit einem anderen Test oder Verfahren bestimmt, wird zusätzlich ein Methodenvergleich durchgeführt. Hierzu werden mindestens 20 Patientenproben parallel getestet. Bei der Auswahl der Patientenproben ist darauf zu achten, dass

diese bei qualitativen Tests schwach positive, stark positive, negative und grenzwertige Erstresultate aufweisen bzw. bei quantitativen Tests den Entscheidungsbereich, aber auch den oberen und unteren Messbereich, abdecken. Die Ergebnisgegenüberstellung kann bei semiquantitativen und qualitativen Tests als sog. Vierfeldertafel oder bei quantitativen Tests mittels entsprechender statistischer Verfahren und Darstellung erfolgen (vgl. Abbildung 2).

Validierung qualitativer In-house-Tests in der Infektionsserologie

Zur Validierung qualitativer In-house-Tests in der Infektionsserologie werden an den Umfang der Inter- und Intraassay-Präzisionsbestimmung die gleichen Anforderungen wie bei CE-gekennzeichneten Tests gestellt. Dazu kommt die Prüfung der Sensitivität, wozu mindestens zehn bekannt positive und mindestens zehn bekannt schwach positive bzw. grenzwertige Proben zu testen sind. Zur Spezifitätsprüfung werden mindestens 20 bekannt negative Proben, sowie potentiell kreuzreaktive Analyte (je Analyt möglichst mindestens drei Proben) untersucht. Als potentiell kreuzreaktiv sind Proben zu werten, die Antikörper gegen andere Viren derselben Familie aufweisen, Rheumafaktor-positive Seren oder Seren mit anderen Autoantikörpern. Es ist darauf zu achten, dass bei der Prüfung Proben eingesetzt werden, die für den potentiell kreuzreaktiven Parameter stark bzw. hoch positiv sind.

Bei quantitativen In-house-Tests ist für die Überprüfung der Intraassay-Präzision die Anzahl der Testproben zu erhöhen. So sind mindestens zwölf verschiedene Proben (Referenzmaterial, Patientenproben oder Poolserum), d.h. drei negative, drei schwach positive, drei höher und drei stark positive Proben einzusetzen und am ersten Tag in Dreifachbestimmung zu untersuchen. Die Interassay-Präzision wird überprüft, indem je eine der am ersten Tag getesteten Proben aus den vier unterschiedlichen Messbereichen an zwei weiteren Tagen in Einfachbestimmung untersucht wird. Die Prüfung von Sensitivität und Spezifität erfolgt in Analogie zum qualitativen In-house-Test. Dazu kommt die Linearitätsbestimmung, wozu mindestens zwei Proben (positives Kontrollmaterial) in einer Zehn- bzw. Fünffach-Verdünnungsreihe mit mindestens vier Verdünnungsstufen im Doppelansatz getestet werden (vgl. Tabelle 1).

Validierung/Verifizierung im Bereich der Virusisolierung auf Zellkulturen

Die Validierung/Verifizierung im Bereich der Virusisolierung auf Zellkulturen gestaltet sich häufig besonders schwierig, da es sich um nicht bzw. nur schwer zu standardisierende Verfahren handelt. Zu überprüfen ist vor allem die Eignung der Zellen für den Nachweis bestimm-

Tabelle 1 Zusammenfassung zum Umfang der Testungen im Rahmen der Validierung/Verifizierung infektionsserologischer Tests sowie Assays zum Nachweis viraler Antigene. Angegeben ist die notwendige Mindestanzahl zu testender Proben sowie ggf. die Mindestanzahl der Replikate.

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

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

ter Viren. Bei Einführung neuer Zelllinien als Indikatorsystem ist deshalb zur Bestätigung der Suszeptibilität die zu validierende Zelle mit dem jeweiligen Referenzvirusstamm und bei Verfügbarkeit zusätzlich mit zwei Patientenisolaten zu infizieren. Dabei sollte nach Möglichkeit mit titriertem Virus und einer Multiplicity Of Infection (MOI) von 0,01–0,1 gearbeitet und die Testung an drei Tagen jeweils im Dreifachansatz erfolgen. Zusätzlich ist eine Paralleltestung der zu validierenden Zelllinien und der bisherigen Indikatorzelle bei mindestens 20 verschie-

denen Patientenproben vorzunehmen und u.a. die Zellviabilität zu protokollieren.

Validierung/Verifizierung von molekulargenetischen Tests

Im Bereich der molekulargenetischen Virusdiagnostik erfolgt ein ähnlicher Prüfumfang zur Validierung/Verifizierung wie in der Infektionsserologie. So sind CE-gekenn-

zeichnete, qualitative Tests analog abzuarbeiten, während bei CE-gekennzeichneten, quantitativen Methoden zur Bestimmung der Intraassay-Präzision mindestens neun verschiedene Proben (Referenzmaterial, Patientenproben oder Poolserum), d.h. drei negative, drei schwach und drei höher positive Proben am ersten Tag in Dreifachbestimmung zu untersuchen sind. Die Interassay-Präzision wird geprüft, indem je eine der am ersten Tag getesteten Proben aus den unterschiedlichen Bereichen an zwei weiteren Tagen in Einfachbestimmung untersucht

werden. Dazu kommt die Prüfung der Linearität, indem ein positives Kontrollmaterial in einer Zehnfach-Verdünnungsreihe mit mindestens drei Verdünnungsstufen im Doppelansatz getestet wird.

Zwingende Voraussetzung zur Durchführung molekularbiologischer In-house-Tests ist, dass ein Abgleich der verwendeten Primersequenzen mit einer Genomdatenbank sowie eine Verifizierung des Amplifikationsproduktes (z.B. mittels Sequenzierung) und das Mitführen einer geeigneten Extraktions- und Amplifikations-Kontrolle

Tabelle 2 Zusammenfassung zum Umfang der Testungen im Rahmen der Validierung/Verifizierung molekularbiologisch-virologischer Tests. Angegeben ist die notwendige Mindestanzahl zu testender Proben sowie ggf. die Mindestanzahl der Replikate.

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

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

nachgewiesen werden. Daneben sollte eine kontinuierliche Kontrolle der Robustheit des Verfahrens und der Reproduzierbarkeit von Messergebnissen erfolgen. Das erfolgt in der Regel durch das Mitführen von quantitativ definierten internen Run Controls. Soweit Kontrollpanel verfügbar sind, sollten diese zusätzlich getestet werden.

Bei qualitativen, molekularbiologischen In-house-Tests erfolgt die Prüfung der Inter- und Intraassay-Präzision sowie der Sensitivität analog den qualitativen infektionsserologischen In-house-Tests. Bei der Spezifitätskontrolle werden mindestens 20 bekannt negative Proben eingesetzt sowie potentiell kreuzreaktive Analyte. Dabei handelt es sich um Proben, die für Viren derselben Familie positiv getestet oder mit potentiell kreuzreaktivem Referenzmaterial aufgestockt wurden. Soweit verfügbar, ist je potentiell kreuzreaktiven Analyten mindestens eine Probe zu testen, die hoch positiv sein sollte, d.h. mindestens 10^5 TCID₅₀/mL oder 10^5 Genomkopien/mL enthält. Die Linearität ist an mindestens zwei Proben (positives oder positiv gespiktes Kontrollmaterial) in einer Zehnfach-Verdünnungsreihe mit mindestens vier Verdünnungsstufen zu prüfen. Der Test ist an zwei verschiedenen Tagen jeweils mindestens im Doppelansatz durchzuführen.

Bei quantitativen molekularbiologischen Methoden ist die Intra- und Interassay-Präzision analog den Vorgaben bei quantitativen, und die Überprüfung der Sensitivität analog der qualitativen infektionsserologischen In-house-Verfahren zu testen. Die Spezifität und Linearität werden analog dem qualitativen molekularbiologischen In-house-Verfahren geprüft (vgl. Tabelle 2).

Zusammenfassend wird konstatiert, dass die Einführung neuer Untersuchungsverfahren bei Einhaltung eines Qualitätsmanagementsystems nach DIN EN ISO 15189 im Bereich der virologischen Laboratoriumsdiagnostik mit einigem Aufwand verbunden ist. Während alle CE-gekennzeichneten Tests zu verifizieren sind, müssen In-house-Verfahren in umfangreicher Form validiert werden.

Durch klar definierte Vorgaben zum Umfang der Verifizierung/Validierung sowie Art und Beschaffenheit der zu testenden Proben können im Vorfeld bereits wesentliche Erleichterungen geschaffen werden.

Danksagung

Für hilfreiche Diskussionen danken wir Frau G. Bauer, Frau Dr. H. Meisel, Frau Dr. S. Nick und Frau G. Schulz.

Literatur

1. Preiser W, Rabenau HF, Doerr HW. Viren-Viruserkrankungen. Synopsis der Epidemiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie viraler Erkrankungen. Steinen (Deutschland): Zett-Verlag, 2002.
2. Rabenau HF, Berger A. Indikationen für die molekulare Diagnostik – Viren. In: Thiemann F, Cullen PM, Klein HG, editors. Leitfaden Molekulare Diagnostik: Grundlagen, Gesetze, Tipps und Tricks für die Praxis. Weinheim (Deutschland): Wiley-VCH, 2006:145–74.
3. Rabenau HF, Werwatz G, Teuber G, Gottschalk R, Wicker S, Berger A, et al. Fallbericht eines falsch-positiven Hepatitis C-Virus-diagnostischen Befundes mit weitreichenden Folgen. J Lab Med 2005;29:393–4.
4. Medizinische Laboratorien-Besondere Anforderungen an die Qualität und Kompetenz (ISO 15189:2003); Deutsche Fassung EN ISO 15189:2003. Berlin (Deutschland): Beuth Verlag GmbH.
5. Entscheidung der Kommission vom 7. Mai 2002 über Gemeinsame Technische Spezifikationen für In-Vitro-Diagnostika (bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2002) 1344); Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 131.
6. Richtlinie 98/79/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Oktober 1998 über In-vitro-Diagnostika; Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 331.
7. Verfahrensanweisung zur Methodvalidierung in der Virologie. Homepage der Gesellschaft für Virologie e.V. <http://www.g-f-v.de>.