

## **Leitfaden des Sektorkomitees Pathologie/Neuropathologie für die Validierung von Untersuchungsverfahren in der Molekularpathologie**

---

**71 SD 4 037** | Revision: 1.1 | 04. Oktober 2016

### **Geltungsbereich:**

Dieser Leitfaden gilt für alle akkreditierten Pathologien/Neuropathologien oder solche, welche die Akkreditierung anstreben, in denen molekularpathologische Untersuchungsverfahren angewendet und die Ergebnisse für die Diagnosestellung und Therapieentscheidung verwendet werden.

Dieses Dokument gibt technische und wissenschaftliche Anleitungen zur Erfüllung der Anforderungen an die Validierung und Verifizierung von molekularpathologischen Untersuchungsverfahren. Weiterhin werden Maßnahmen zur Validierung und Verifizierung von molekularpathologischen Untersuchungsverfahren beschrieben, die neu eingeführt oder modifiziert werden sollen.

**Datum der Bestätigung durch den Akkreditierungsbeirat: 28.09.2016**

In diesem Dokument wird im Interesse der Lesbarkeit grundsätzlich die männliche Form von Funktionsbezeichnungen verwendet; dies schließt die weibliche Form ein.

## Hinweis:

Dieses Dokument entstand durch die Arbeit des Unterausschusses „Molekularpathologie“ der DAkKS.

In diesem Unterausschuss waren tätig (alphabetische Reihenfolge):

Dr. rer. nat. Marcus Bettstetter (München), Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Dietmaier (Regensburg),

Prof. Dr. med. Arndt Hartmann (Erlangen), Prof. Dr. med. Heinz Höfler (München),

PD Dr. rer. nat. Sabine Merkelbach-Bruse (Köln), Prof. Dr. med. Richard Meyermann (Tübingen),

PD Dr. med. Petra Rümmele (Erlangen), Dr. med. Matthias Sperling (Braunschweig)

Änderungen im Vergleich zur vorhergehenden Fassung sind **gelb** hervorgehoben oder mit einer Markierung am Seitenrand versehen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zweck / Geltungsbereich .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Begriffe.....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Beschreibung .....</b>	<b>5</b>
3.1	Beschreibung des molekularpathologischen Untersuchungsverfahrens.....	5
3.2	Definition der zu bestimmenden <b>Leistungskenndaten</b> .....	7
3.3	Ermittlung der <b>Leistungskenndaten</b> .....	8
3.4	Freigabe validierter Verfahren.....	11
3.5	Validierung von Verfahrensänderungen.....	11
3.6	Verifizierung.....	11
3.7	Dokumentation und Archivierung .....	11
3.8	Externe Qualitätssicherungsmaßnahmen .....	11
<b>4</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>12</b>

## 1 Zweck / Geltungsbereich

Der vorliegende Leitfaden beschreibt die Grundlagen, die Durchführung und die Dokumentation der Validierung von Untersuchungsverfahren im Bereich Molekularpathologie.

Dieses Dokument dient Begutachtern und Mitarbeitern aus Einrichtungen für Pathologie/Neuropathologie zur Information sowie zur praktischen Anleitung.

In den Abschnitten „Anmerkungen für die praktische Umsetzung“ wurden lediglich einige praktische Beispiele erläutert. Diese Abschnitte (im Text kursiv dargestellt) decken keineswegs alle Aspekte ab, die bei der praktischen Umsetzung der Verfahren zu berücksichtigen sind. Die konkrete Vorgehensweise in der Praxis bleibt in der Verantwortung der Inspektionsstelle.

## 2 Begriffe

### Validierung

Bestätigung durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die Anforderungen für einen spezifischen beabsichtigten Gebrauch oder eine spezifische beabsichtigte Anwendung erfüllt worden sind. (ISO 9000:2005, 3.8.5, DIN EN ISO 15189:2014)

### Validierung von Untersuchungsverfahren im Bereich Molekularpathologie

Die molekularpathologische Untersuchung basiert auf einer stufendiagnostischen\* Vorgehensweise, bei der es sich um eine Inspektionstätigkeit handelt und die eine sachverständige Beurteilung (Molekularpathologische Begutachtung) beinhaltet.

Deswegen ist sie in dem Fachbereich Pathologie nach der Norm DIN EN ISO/IEC 17020 zu akkreditieren. Für die analytischen Schritte der Stufendiagnostik gelten sinngemäß die Anforderungen der DIN EN ISO/IEC 17025 sowie der DIN EN ISO 15189 (ILAC-P15:06/2014). Sämtliche Verfahren müssen vor der Einführung in die Routinediagnostik vollständig validiert sein. Diese müssen nachweislich reproduzierbar richtige Ergebnisse liefern.\*

### Verifizierung

Bestätigung durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass festgelegte Anforderungen erfüllt worden sind. (ISO 9000:2005, 3.8.4, DIN EN ISO 15189:2014)

---

\* Siehe 71 SD 4 001 Pkt. 7.1

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

„CE-Tests“: Bei „CE gekennzeichneten Testsystemen“ handelt es sich um Tests, die an anderer Stelle entwickelt und als kommerzieller Reagenzienkit mit CE- Kennzeichnung vertrieben werden. Die Validierung des Verfahrens wurde vom Hersteller durchgeführt und die wesentlichen **Leistungskenndaten** liegen vor.

Für die Verfahren, die vom Hersteller validiert wurden und genau gemäß Herstellervorgaben angewandt werden, beginnt die Verifizierung mit der Überprüfung der angegebenen Leistungskenndaten, vor der Freigabe des Verfahrens für die Routinediagnostik.

„In-house Test“: Bei „In-house Tests“ handelt es sich um Verfahren, die von der Einrichtung für Pathologie/Neuropathologie selbst entwickelt oder auf der Basis externer wissenschaftlicher Arbeiten etabliert wurden. Die Einrichtung für Pathologie/Neuropathologie ist in diesem Fall für den Nachweis der Eignung des Verfahrens in der entsprechenden Anwendung verantwortlich („Validierung“). Bei Verfahren, die auf der Basis externer wissenschaftlicher Arbeiten etabliert wurden, kann der Umfang der Validierung ggf. reduziert werden.

Die Validierung und die Verifizierung des Verfahrens sind als ineinander fließende Prozesse zu betrachten. Die kontinuierliche Verifizierung der angewendeten Verfahren in der Routinediagnostik ist als einer der wichtigsten hausinternen Qualitätssicherungsmaßnahmen zu betrachten. Die Verifizierung muss sicherstellen, dass die Leistungskenndaten, die bei der Validierung des Verfahrens ermittelt wurden, kontinuierlich erreicht werden und das Verfahren somit reproduzierbar und stabil abläuft.

### **Ziel der Validierung**

Das Ziel der Validierung von Verfahren ist, nachvollziehbar den Nachweis zu erbringen, dass mit einem Verfahren die vorgegebene, spezifische Aufgabe erfüllt werden kann.

Bei molekularpathologischen Verfahren stehen die Sensitivität, die Spezifität, die Richtigkeit (Erkennung und Vermeidung systematischer Fehler) und die Präzision der Ergebnisse im Vordergrund.

Bei qualitativen Analysen bezieht sich die Präzision auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Wiederhol- und Vergleichspräzision).

Bei der Validierung von Verfahrensänderungen sind Aussagen zum Einfluss dieser Veränderungen (Robustheit der Methode) erforderlich, d. h. hier muss der Nachweis erbracht werden, dass sich das Versuchsergebnis gegenüber dem ursprünglichen Verfahren nicht verändert.

Die Validierung von Verfahren besteht aus drei wesentlichen Schritten:

- **Beschreibung des molekularpathologischen Untersuchungsverfahrens**

Präzise Beschreibung des Verfahrens in einer Verfahrensanweisung

- **Definition der zu bestimmenden** Leistungskenndaten

Vergleich der Leistungskenndaten mit den für die Aufgabe benötigten Eigenschaften (Qualitätsforderungen)

- **Ermittlung der** Leistungskenndaten

Führung eines Nachweises, dass die Qualitätsforderungen in diesem speziellen Fall tatsächlich erfüllt sind.

### **3 Beschreibung**

#### **3.1 Beschreibung des molekularpathologischen Untersuchungsverfahrens**

Das Verfahren stellt die Gesamtheit aller Verfahrensschritte dar, die notwendig sind, um die Aufgabe ausführen zu können.

Das zu akkreditierende Verfahren muss vollständig dokumentiert sein, sodass ein Fachgutachter dieses ohne zusätzliche Informationen bewerten kann. Die Verfahrensbeschreibung muss mindestens folgende Aussagen enthalten (vergl. DIN EN ISO 15189; Punkt 5.5.3):

- a) Zweck der Untersuchung;
- b) Grundlage und Methode des für die Untersuchungen angewendeten Verfahrens;
- c) Leistungsmerkmale (z. B. Präzisierung der Zielregion bei Mutationsanalysen);
- d) Materialangabe (Fixierungs- und Versandbedingungen, Frischmaterial, formalinfixiertes Material, Paraffinblöcke etc.);
- e) Angaben über die korrekte Vorbereitung der Proben (z. B. Dissektion);
- f) erforderliche Ausrüstung und Reagenzien;
- g) Umwelt- und Sicherheitsmaßnahmen (Anweisung „Gefahren und Gefahrstoffe“ ggf. separat);
- h) Kalibrierverfahren (metrologische Rückführbarkeit);
- i) Schritte im Arbeitsablauf;
- j) Verfahren der Qualitätssicherung;

- k) Kurzbeschreibung des Verfahrens zur Ergebnisberechnung oder Versuchsauswertung einschließlich der Messunsicherheit der gemessenen Größenwerte (falls zutreffend);
- l) Referenzbereiche oder klinische Entscheidungswerte (falls zutreffend);
- m) Anweisungen zur Bestimmung quantitativer Ergebnisse, wenn ein Ergebnis nicht innerhalb des Messbereichs liegt (falls zutreffend);
- n) alarmierende oder kritische Werte (falls zutreffend);
- o) Befundinterpretation;
- p) mögliche Ursachen von Abweichungen;
- q) Verweise (z. B. Literatur, verwendete Softwaretools Richtlinien).

**Anmerkungen für die praktische Umsetzung:**

Zur Beschreibung gehört beispielsweise bei einem PCR-Test eine genaue in-silico Analyse der Zielsequenzen, in der folgende Fragestellungen abzuklären sind:

- Gibt es Polymorphismen an den Primerbindestellen?
- Haben die Primersequenzen weitere signifikante Homologien?
- Gibt es homologe Zielsequenzen (z. B. Pseudogene) und falls ja wird deren Amplifikation diskriminiert?
- Erfasst das Amplikon alle signifikanten Bereiche bzw. welche relevanten Mutationshotspots werden erfasst und welche ggf. nicht?

Hierzu können neben anderen die gängigen Datenbanken und frei zugängliche Softwaretools wie BLAST, Ensembl und COSMIC genutzt werden.

Das zu beschreibende Protokoll ergibt sich aus der Etablierungsphase, die der Validierung vorausgeht. Hier werden die technischen Parameter des neuen Verfahrens getestet und ggf. so angepasst, dass eine stabile Analyse im Routinebetrieb technisch möglich ist. Die Validierung erfolgt nach diesem Protokoll.

### 3.2 Definition der zu bestimmenden **Leistungskennndaten**

Zur Leistungsbewertung von Analysenverfahren werden üblicherweise folgende **Leistungskennndaten** verwendet: Genauigkeit (Präzision, Richtigkeit) und Trennschärfe (analytische Sensitivität, Spezifität).

#### 3.2.1 Genauigkeit

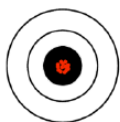
- **Präzision**

Die Präzision charakterisiert das Ausmaß der Streuung unabhängiger Analysenergebnisse an derselben Probe. Üblicherweise wird unterschieden zwischen Intraassay-Präzision (Präzision innerhalb eines Reaktionsansatzes) und Interassay-Präzision (Präzision zwischen verschiedenen Reaktionsansätzen) (vgl. Abb. 1).

- **Richtigkeit**

Die Richtigkeit kennzeichnet das Ausmaß der Übereinstimmung der Ergebnisse mit dem Erwartungswert. Dieser kann entweder mit einer zuvor etablierten Standardmethode oder an einem Referenzkollektiv ermittelt werden oder wissenschaftlich begründet sein (vgl. Abb. 1).

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



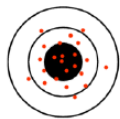
**Präzise und richtig**

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



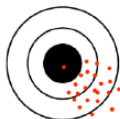
**Präzise aber unrichtig**

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



**Richtig aber unpräzise**

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



**Unrichtig und unpräzise**

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

aus: [http://www.med4you.at/laborbefunde/allgemeines/lbef\\_qualitaet.htm#Pr](http://www.med4you.at/laborbefunde/allgemeines/lbef_qualitaet.htm#Pr)

### 3.2.2 Trennschärfe

- **Analytische Sensitivität**

Die analytische Sensitivität ist ein Maß für die Rate der richtig positiven Ergebnisse. Sie beschreibt das Verhältnis richtig positiver Ergebnisse zu der Gesamtzahl positiver Ergebnisse:

Anzahl richtig positiv / (Anzahl richtig positiv + Anzahl falsch negativ).

Die analytische Sensitivität ist zu unterscheiden von der technischen Nachweisgrenze (limit of detection; LOD). Dies ist die geringste nachweisbare Menge, die (bei einem 95%-Konfidenzintervall) unterscheidbar ist vom Hintergrund bzw. von den Negativkontrollwerten. Die Bestimmung der Nachweisgrenze kann für einzelne Verfahren sinnvoll sein.

- **Spezifität**

Die Spezifität ist ein Maß für die Rate der richtig negativen Ergebnisse. Sie beschreibt das Verhältnis richtig negativer Ergebnisse zu der Gesamtzahl negativer Ergebnisse:

Anzahl richtig negativ / (Anzahl richtig negativ + Anzahl falsch positiv).

### 3.3 Ermittlung der **Leistungskenn**daten

Das Ergebnis der Leistungscharakterisierung, d. h. Ermittlung der einzelnen Kenn

daten, muss nachvollziehbar und vollständig dokumentiert sein. Die Bestimmung der charakteristischen **Kenn**daten erfolgt für den zu erwartenden und zu definierenden Anwendungsbereich. Entsprechend dieser **Kenn**daten sollen folgende Analysen dabei einzeln oder in Kombination zur Anwendung kommen.

#### 3.3.1 Ermittlung von **Genauigkeitskenn**daten

##### 3.3.1.1 Ermittlung der Präzision

Die **Interassay Präzision** bezeichnet die Übereinstimmung zwischen wiederholten Bestimmungen an verschiedenen Aliquots derselben Probe in verschiedenen Reaktionsansätzen.

**Anmerkungen für die praktische Umsetzung:**

*Es ist wichtig zu klären: Generiert die Methode bei derselben Probe in einer angemessenen Anzahl verschiedener Versuchsansätze reproduzierbare Ergebnisse?*

*Beispiel: Dieselben Proben werden an zwei weiteren Tagen in Einfachbestimmung untersucht.*



Die **Intraassay Präzision** bezeichnet die Übereinstimmung von Parallelbestimmungen einer oder mehrerer Proben innerhalb eines Reaktionsansatzes (eine angemessene Anzahl Parallelbestimmungen an verschiedenen Aliquots derselben Probe).

**Anmerkungen für die praktische Umsetzung:**

*Es ist wichtig zu klären: Generiert die Methode bei paralleler Bestimmungen einer angemessenen Anzahl verschiedener Aliquots derselben Probe in einem Versuchsansatz reproduzierbare Ergebnisse?*

*Beispiel: Mindestens je eine bekannt positive und eine bekannt negative Probe werden in Dreifachbestimmung untersucht. Die Zusammensetzung dieser Kontrollen sollte dabei dem Patientenmaterial entsprechen.*

*Bei quantitativen Analyseverfahren empfiehlt sich zudem die Bestimmung des linearen Messbereichs durch Spiking-Experimente und Verdünnungsstufen.*

### **3.3.1.2 Ermittlung der Richtigkeit**

Die **Richtigkeit** eines Verfahrens kann durch Vergleich der Ergebnisse mit den Ergebnissen eines validierten Standardverfahrens oder mit einem validierten Referenzkollektiv ermittelt werden. Steht beides nicht zur Verfügung, müssen die ermittelten Werte wissenschaftlich begründeten Erwartungswerten entsprechen.

Die Bestimmung der Richtigkeit sollte ebenfalls mit einer angemessenen Probenanzahl durchgeführt werden und kann mit der Bestimmung der Präzision kombiniert werden.

**Anmerkungen für die praktische Umsetzung:**

*Üblicherweise werden Proben verwendet, bei denen der Testparameter bereits durch ein validiertes Verfahren bestimmt wurde. Die Anzahl der Validierungsproben sollte der Verfügbarkeit angemessen sein. Die Zusammensetzung der Validierungsproben sollte dem in der Routine zu erwarteten Materialspektrum (z. B. DNA aus FFPE-Gewebe) entsprechen.*

*Wird ein neues Verfahren validiert, dessen technische Sensitivität (LOD) die des bisherigen Standardverfahrens übertrifft, besteht die Möglichkeit, dass zuvor negativ getestete Validierungsproben mit dem neuen, sensitiveren Verfahren positiv getestet werden. Weisen alle Ergebnisse der Validierung und die Eigenschaften der diskrepanten Probe auf die Richtigkeit des neuen Ergebnisses hin, kann man einem reproduzierbaren, wissenschaftlich begründbaren Ergebnis des neuen Verfahrens vertrauen und muss folglich die Erstbewertung der Probe korrigieren.*

*Für die Überprüfung der Richtigkeit sind z. B. externe Ringversuchsproben bzw. die Teilnahme an Ringversuchen geeignet.*

### 3.3.2 Ermittlung der Trennschärfe

Die Überprüfung von neuen Verfahren auf analytische Sensitivität und Spezifität soll an einer angemessenen, möglichst großen Anzahl von Proben mit bekanntem Testparameter durchgeführt werden.

#### 3.3.2.1 Ermittlung der analytischen Sensitivität

Bestimmbar durch Verifizierungsuntersuchung bekannter Positiv-Fälle

Analytische Sensitivität = Anzahl richtig positiv / (Anzahl richtig positiv + Anzahl falsch negativ)

##### **Anmerkungen für die praktische Umsetzung:**

*Hier können z. B. Proben eingesetzt werden, die mit einem anderen validierten Standardverfahren in einem anderen (Referenz-)Institut getestet wurden.*

#### 3.3.2.2 Ermittlung der analytischen Spezifität

Bestimmbar durch Verifizierungsuntersuchung bekannter Negativ-Fälle

Analytische Spezifität = Anzahl richtig negativ / (Anzahl richtig negativ + Anzahl falsch positiv)

##### **Anmerkungen für die praktische Umsetzung:**

*Hier können z. B. Proben eingesetzt werden, die mit einem anderen validierten Standardverfahren in einem anderen (Referenz-)Institut getestet wurden.*

*Praktische Anmerkungen: siehe auch 3.1*

#### 3.3.2.3 Ermittlung der Nachweisgrenze (falls erforderlich)

Die LOD gibt an, welche Menge bzw. welcher Anteil an **Zielstrukturen** in der Probe zur sicheren Detektion vorhanden sein muss (s. 2.2). Beide Parameter, absolute Menge und Anteil, betreffen das LOD. Diese Größen sind wichtig, um die Aussagekraft der Analyseergebnisse an einer Patientenprobe beurteilen zu können.

##### **Anmerkungen für die praktische Umsetzung:**

*Die LOD kann z. B. durch Verdünnungsreihen (Spiking-Experimente) aus Wildtyp (wt) und mutierter (mut) DNA ermittelt werden.*

*Die wt- und die mut-DNA müssen zuvor auf exakt dieselbe Konzentration eingestellt werden. Die einzustellende Konzentration richtet sich nach der in der Routine üblichen Werten. Beide Proben müssen eine vergleichbare Amplifizierbarkeit (Qualität) der DNA aufweisen. Dies kann z. B. mit einer qPCR überprüft werden.*

### **3.4 Freigabe validierter Verfahren**

Neuentwickelte bzw. adaptierte Verfahren müssen vor ihrer Verwendung auf der Grundlage der Validierungsergebnisse durch den zuständigen Abteilungsleiter (in diesem Fachbereich qualifizierter Naturwissenschaftler oder Facharzt) ausdrücklich freigegeben werden. Dazu ist die Entscheidung zu treffen, ob die Qualitätsanforderungen des Verfahrens erreicht wurden und es für die vorgesehenen Untersuchungen in der Inspektionsstelle eingesetzt werden kann.

Die Qualifikation des Mitarbeiters, der befugt ist, die Validierung des Verfahrens zu bestätigen und somit das Verfahren für die Routine freizugeben, muss nachgewiesen werden.

### **3.5 Validierung von Verfahrensänderungen**

In den Fällen, in denen aus analytischen oder organisatorischen Gründen (z. B. Reagenzienwechsel) eine Umstellung eines Verfahrens erforderlich ist, muss dieses Verfahren erneut validiert und ggf. für die Routine freigegeben werden. Der Umfang der Validierung ist von der konkreten Änderung abhängig.

### **3.6 Verifizierung**

Das freigegebene Verfahren ist im laufenden Betrieb durch geeignete **Kontrollmechanismen** ständig zu verifizieren.

### **3.7 Dokumentation und Archivierung**

Alle Daten, die zur Ermittlung der charakteristischen **Leistungsdaten** von Verfahren ermittelt wurden, sind aufzuzeichnen und zusammen mit dem Freigabevermerk bis mindestens fünf Jahre nach der letzten Anwendung des betreffenden Verfahrens aufzubewahren.

Die PCR-Produkte des Validierungsverfahrens sowie die dissezierten Schnitte müssen bis zum Abschluss der Validierung archiviert werden.

### **3.8 Externe Qualitätssicherungsmaßnahmen**

Externe Qualitätssicherungsmaßnahmen beinhalten:

- Teilnahme an Eignungsprüfungen (z. B. wenn angeboten an Ringversuchen mindestens alle 2 Jahre)
- wenn für einen Parameter kein Ringversuch angeboten wird, sind Vergleichsversuche zwischen Einrichtungen anzustreben

#### **4 Literatur**

DIN ISO 5725-2:2002-12	Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen- Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichspräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens
DIN 32645:2008-11	Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung, 2008
DIN EN ISO 15189:2014	Medizinische Laboratorien- Anforderungen an die Qualität und Kompetenz
71 SD 4 028	Leitfaden des Sektorkomitee Pathologie/Neuropathologie für die Validierung von Untersuchungsverfahren in der Immunhistochemie
71 SD 4 019	Validierung von Prüfverfahren im Geltungsbereich des Scopes des SK – Chemie und Umwelt
Verfahrensanweisung zur Methodenvalidierung (Stand 02.2015)	Gesellschaft für Virologie e. V.