

Anforderungen an die Validierung bzw. den Routinebetrieb von Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken (NATs) zum Nachweis von Virusnukleinsäuren in Spenderblut

1. Einführung

Die Anforderungen gelten für NAT-Verfahren, die für das Screening von Blut- und Stammzellspendern zum Nachweis von Nukleinsäuren viraler Erreger eingesetzt werden. Grundlegende Elemente dieser Anforderungen sind nicht erregerspezifisch und können somit auf NAT-Verfahren für den Nukleinsäurenachweis weiterer Viruserreger, die nicht mittels PEI-Stufenplänen geregelt sind, angewendet werden. Diese Anforderungen sind auch für die Validierung bzw. den Routinebetrieb von NAT-Verfahren, die für das Gewebespenderscreening verwendet werden, gültig. Darüber hinaus sind zusätzliche Anforderungen bei der Testung von postmortalen Spenden zu beachten (siehe dazu PEI-Webseite: Spenderscreening bei der Gewebespende: Validierungsempfehlungen für Testsysteme bei der Verwendung von Leichenblut).

NAT-Verfahren bestehen aus mehreren Teilschritten, von denen jeder einzelne die Effizienz und Qualität des Gesamtverfahrens beeinflussen kann:

- Abnahme, Lagerung, Transport und Vorbereitung der Proben (Präanalytik)
- evtl. Herstellung von "Minipools"
- Extraktion der viralen Nukleinsäuren (DNA und/oder RNA)
- reverse Transkription viraler RNA in komplementäre DNA
- Amplifikation von DNA-Abschnitten
- Detektion der Amplifikate

Eine Validierung durch den Anwender soll zeigen, ob die gewählte Methode unter Berücksichtigung der zugrundeliegenden Mindestanforderungen für das Spenderscreening geeignet ist.

Grundsätzlich können für das Spenderscreening folgende NAT-Verfahren verwendet werden:

- In-Haus-Methoden: selbst entwickelte NAT-Verfahren oder modifizierte CE-zertifizierte NAT-Verfahren, bei denen entscheidende Parameter, wie z. B. die Extraktionsmethode, geändert wurden
- CE-zertifizierte Non-Screening-NAT-Tests, die mit geändertem Verwendungszweck nach Herstellerangaben durchgeführt werden (sog. "off-label-use")
- CE-zertifizierte Screening-NAT-Tests, die nach Herstellerangaben durchgeführt werden

Wird ein CE-zertifiziertes NAT-System verwendet, kann für Teilaspekte, die bereits durch den Hersteller validiert und gegenüber dem PEI belegt wurden, auf die Validierungsdaten des Herstellers verwiesen werden.

Werden CE-zertifizierte NAT-Tests, deren Verwendungszweck nicht das Spenderscreening ist (z. B. Tests zum quantitativen Virusnachweis), streng nach Herstellerangaben durchgeführt (sog. „off-label-use“), muss der Anwender zusätzliche Maßnahmen durchführen, die eine Tauglichkeit für das Spenderscreening belegen, wie z. B. die Festlegung des Ergebnisbefundes (reaktiv / nicht reaktiv), die Definition der Poolgröße (max. 96), die Validierung der analytischen Nachweisgrenze in Abhängigkeit von der eingesetzten Poolgröße, die Auflösungstestung von reaktiven Spenderpools und das Mitführen entsprechender Laufkontrollen.

2. Validierungsanforderungen

Bei NAT-Verfahren, die für das Spenderscreening eingesetzt werden, sind für die Gesamtmethode folgende Validierungspunkte abzudecken bzw. im Routinebetrieb zu kontrollieren:





2.1 Spezifität

Bestimmung der Identität des Reaktionsproduktes, Ausschluss falsch-positiver Befunde

Die Spezifität einer NAT-Methode kann bereits im Vorfeld durch die Auswahl von Primern und Sonden sowie durch die Festlegung stringenter Reaktionsbedingungen weitestgehend gewährleistet werden. Eine Überprüfung der Primer/Sonden-Sequenzen auf mögliche Homologien mit allen Sequenzen in einer Gen-Datenbank verringert zusätzlich das Risiko unerwünschter Amplifikationsnebenprodukte.

Die Identität des Amplifikats ist durch zusätzliche Untersuchungen (z. B. exakte Größe, Sequenz, Restriktionsmuster, Hybridisierung mit einer Sonde) zu belegen.

Zur Validierung der Spezifität sind mindestens 100 verschiedene negative Plasmaproben bzw. -pools zu testen.

Die mögliche Kontamination durch positives Probenmaterial oder Amplifikate fällt nicht unter den Begriff der methodischen Spezifität, ihre Vermeidung stellt jedoch in der Praxis eine große Herausforderung dar. Für die Erkennung von Kontaminationen durch Amplifikate sowie für die Bestätigung positiver Befunde sollte zumindest der Zugang zu einem zweiten Amplifikationssystem bestehen, das eine andere Zielregion benutzt und eine vergleichbare Empfindlichkeit besitzt.

Für WNV-NAT Suchteste ist besonders zu beachten, dass diese unter Umständen mit weiteren Viren des Japanischen-Encephalitis-Virus-Serokomplexes (hier besonders relevant das Usutu-Virus) kreuzreagieren können. Reaktive WNV-NAT-Suchtests sollten deshalb durch ein zweites, WNV-spezifisches NAT-System und/oder durch weitere Differentialdiagnostik bestätigt werden. Ein Bestätigungstest kann nach vorheriger Rücksprache durch das Bernhardt-Nocht-Institut (www.bnitm.de) erfolgen.

2.2 Sensitivität

a) Analytische Nachweisgrenze

Nach heutigem Stand der Wissenschaft und Technik wird die analytische Sensitivität oder Nachweisgrenze einer NAT-Methode (sog. LOD = limit of detection) durch den 95% positiven Cut-off-Wert angegeben. Dieser Wert entspricht der Konzentration der Zielnukleinsäure, bei der in 95% der Experimente reaktive Befunde angezeigt werden (siehe dazu auch PCR-Monographie der Europäischen Pharmakopöe, sowie die Gemeinsamen Technischen Spezifikationen für In-Vitro-Diagnostika der Richtlinie 98/79/EC).

Im Rahmen der Festlegung der viralen Nukleinsäurekonzentration, die für das Spenderscreening in einer positiven Einzelspende detektiert werden muss (5.000 IU HCV-RNA/mL, basierend auf dem WHO-Standard HCV-RNA; 10.000 IU HIV-1-RNA/mL, basierend auf dem WHO-Standard HIV-1-RNA, 2.000 IU HEV-RNA/mL, basierend auf dem WHO-Standard HEV-RNA; 250 Kopien WNV-RNA/mL, basierend auf dem WNV-RNA-Referenzreagenz der kanadischen Gesundheitsbehörde), wurde zugrunde gelegt, dass diese regelmäßig, d. h. häufiger als in 95% der Fälle, erkannt werden soll (der Nachweis für 100% der Fälle ist aus statistischen Gründen nicht zu erbringen).

Die Nachweisgrenze wird durch mindestens drei unabhängige Verdünnungsreihen (Faktor 2 oder halb-logarithmisch zur Basis 10) des WHO-Standards bzw. eines gegen den WHO-Standard kalibrierten Referenzpräparates (siehe unten) bestimmt, wobei jeder Verdünnungspunkt in 8 Replikaten analysiert werden sollte. Die Verdünnungsreihe sollte mindestens 5 (Verdünnungsfaktor 2) bzw. 3 (Verdünnungsfaktor halb-logarithmisch zur Basis 10) Punkte oberhalb des positiven Cut-off-Wertes (95%) umfassen. Die Berechnung des 95%-Wertes sollte mit geeigneten statistischen Verfahren, z. B. einer Probit-Analyse (für logarithmierte Dosiswerte), erfolgen.

Die festgelegten Nachweisgrenzen für HCV-, HEV-, HIV-1- und WNV-RNA im Spenderblut (siehe oben) sind jeweils für die bekannten Geno-/Subtypen bzw. Linien zu gewährleisten. Bei NAT-Verfahren, die mehr als eine Zielregion abdecken (wie z. B. für die HIV-1-NAT vorgeschrieben) ist die Nachweisgrenze für jede Zielregion zu belegen.

Die Konzentrationsangabe in IU/mL basiert auf der Kalibrierung mit dem entsprechenden WHO-Standard. Manche Testhersteller geben aus historischen Gründen (z. B. für quantitative HIV-1-NAT-



Tests) die Konzentration in Kopien viraler Nukleinsäure/mL bzw. Genomäquivalenten/mL an. Die Packungsbeilage kommerzieller NAT-Tests gibt hier den testspezifischen "Konversionsfaktor" von IU zu Kopien an.

Die internationalen Standards der WHO für HCV- und HIV-1-RNA sind über das National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) in Großbritannien (www.nibsc.org) bzw. für HEV-RNA über das Paul-Ehrlich-Institut (www.pei.de/who-reference-material) erhältlich. Die Etablierung eines internationalen Standards der WHO für WNV-RNA ist für Ende 2020 geplant. Sobald dieser verfügbar ist, muss eine Rekalibrierung der analytischen Nachweisgrenze der für das WNV-Spenderscreening verwendeten NAT-Methoden mit Bezug auf IU/mL durchgeführt werden. Eine entsprechende Anpassung der Nachweisgrenze für WNV-RNA in Spenderblut wird zeitnah durch das PEI erfolgen.

Da die Abgabe der lyophilisierten WHO-Standards limitiert ist, ist die Herstellung oder der Bezug von Referenzpräparaten, die am WHO-Standard kalibriert wurden, unumgänglich (sogenannte Sekundärstandards).

Lyophilisierte Sekundärstandardpräparate für HCV-RNA, HIV-1-RNA und HBV-DNA, sowie ein HEV-RNA-Kontrollmaterial, können über das PEI bezogen werden (www.pei.de/DE/infos/pu/referenzmaterial/referenzmaterial-node.html). Diese Materialien können für Validierungsstudien oder die Herstellung von Kontrollen (siehe unten) eingesetzt werden. Ein lyophilisiertes Sekundärstandardpräparat für WNV-RNA, kalibriert am internationalen Standard der WHO, befindet sich in der Entwicklung.

b) Kontrollen

Die Nachweisgrenze wird durch das regelmäßige Mitführen entsprechend niedrig eingestellter Positivkontrollen (Laufkontrollen) kontrolliert, die zusammen mit den Proben aufgearbeitet werden. Laufkontrollen sind entweder parallel mitgeführte Proben (die Konzentration an viraler Nukleinsäure in diesen Proben hängt von der gewählten Poolgröße ab und spiegelt die festgelegte Mindestempfindlichkeit bezogen auf die Einzelspende wider) oder stellen einen entsprechend mit viraler Nukleinsäure versetzten ("gespikten") Negativpool dar. Durch die Analyse von Proben mit Konzentrationen viraler Nukleinsäuren unterhalb der "100%"-Nachweisgrenze und den Vergleich der Häufigkeit von positiven Resultaten mit den Untersuchungen bei der Validierung der Methode lässt sich eine eventuelle Verschlechterung der Sensitivität erkennen (Trendkontrolle). Weitere Regelungen für Laufkontrollen siehe auch Punkt 2.6.

Parallel mitgeführte Negativkontrollen (mindestens eine pro Lauf) sollen eine eventuelle Kontamination anzeigen.

c) Genotypen, Subtypen, Mutationen

Durch die entsprechende Auswahl von Primern und Sonden ist eine Erkennung der bekannten Geno- und Subtypen bzw. Linien zu gewährleisten und (soweit verfügbar) an typisierten Proben, die der dreifachen LOD-Konzentration entsprechen, zu überprüfen. Entsprechende Panels können u.a. über das National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) in Großbritannien (www.nibsc.org) und das Paul-Ehrlich-Institut (www.pei.de/DE/regulation/referenzmaterial/referenzmaterial-node.html?cms_tabcounter=4) bezogen werden.

Neu auftretende Mutationen im Zielbereich von HIV-1 sind durch Einsatz einer Dual-Target-Strategie im Testsystem abzudecken (siehe Punkt 2.2.a).

d) Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität von qualitativen NAT-Tests ist anhand von 10 geeigneten Serokonversionspanels, soweit verfügbar, zu untersuchen. Diese sind kommerziell erhältlich und können von verschiedenen IVD-Herstellern bezogen werden (z. B.: Biomex GmbH, Heidelberg; SeraCare, Milford, MA, USA; ZeptoMetrix Corp., Buffalo, NY, USA).



2.3 Präzision

Die Intra-Assay-Variabilität ist durch wiederholte Extraktion (8 Ansätze) einer schwach-positiven Probe (bis zum dreifachen der LOD) mit einer Charge von Reagenzien, die Inter-Assay-Variabilität durch wiederholte Extraktion der Probe (8 Ansätze) mit verschiedenen Chargen von Reagenzien zu untersuchen. Die Untersuchungen zur Nachweisgrenze (Punkt 2.2.a) können diese Punkte bereits teilweise abdecken.

Die laborinterne Variation ist durch Durchführung der Methode an verschiedenen Tagen, durch verschiedene Personen, unter Benutzung der verschiedenen Geräte zu überprüfen.

Für entsprechend kontrollierte Kombinationen von Reagenzien (z. B. Puffer, Enzyme, Primer) sollen Testchargen definiert werden, deren Haltbarkeit festgelegt sein muss.

Neue Chargen von Primern, Enzymen, Puffern, dNTPs etc. sollen zuvor einer Eingangskontrolle auf volle Funktionsfähigkeit unterzogen werden.

Geräteinterne Kontrollprogramme sollen regelmäßig abgerufen werden, um eine eingeschränkte Funktion rechtzeitig zu erkennen.

Durch Blindproben, die in den Routinebetrieb eingestreut werden, soll die Funktionsfähigkeit der Methode kontrolliert werden.

2.4 Reproduzierbarkeit

Die Übereinstimmung der Testergebnisse zwischen verschiedenen Labors wird anhand von Kontrollpanels im Rahmen von Ringversuchen überprüft, die von verschiedenen Anbietern erhältlich sind (z. B. www.instand-ev.de, www.rfb.bio oder www.qcmd.org).

Für Testlabore, die In-Haus hergestellte NAT-Verfahren für das Screening von Blut- und Stammzellspendern einsetzen, ist die Teilnahme an Ringversuchen, die das PEI in diesem Zusammenhang anbietet, obligatorisch.

2.5 Robustheit

Eine mögliche Kreuzkontamination wird durch die Untersuchung von mindestens 5 Reihen mit abwechselnd bekannt natürlich hoch positiven vorkommenden und negativen Proben abgedeckt. Wird für mehrere virale Marker die gleiche Testplattform verwendet, reicht es aus, die Untersuchung exemplarisch an einem Marker durchzuführen.

Um die zu falsch negativen Befunden führende Fehlerrate des Gesamtsystems zu validieren, sind mindestens 100 Proben zu untersuchen, die mit der dreifachen LOD-Konzentration angereichert sind. Als Akzeptanzkriterium gilt, wenn 99 positive Befunde bei 100 Tests erreicht werden.

Der Ausschluss von Schwankungen bei der Testdurchführung wird durch Erstellung und Befolgen detaillierter Arbeitsanleitungen, entsprechendes Training des Personals und durch das Einfügen von Kontrollproben (siehe Punkt 3) gewährleistet. Positive Proben aus der diagnostischen Fensterphase der entsprechenden Virusinfektionen sind in der Validierungsphase einzusetzen, um die Gefahr der Kontamination durch hochpositives Ausgangsmaterial (z. B. Verschleppen beim Pipettieren etc.) zu untersuchen.

2.6 Validierung der Testung von Minipools

Bei der Testung von Minipools muss die gewählte Methode so ausgelegt sein, dass die unter Punkt 2.2.a bzw. im Stufenplan genannten Mindestanforderungen an die Sensitivität für den Nachweis von HCV-, HIV-1-, HEV- und WNV-RNA in Spenderblut erfüllt sind.

Die Auflösungstestung von Pools kann für die jeweils verwendete NAT-Plattform und die festgelegte Poolgröße beispielhaft für einen Virusmarker gezeigt werden. Hierbei ist die Untersuchung von acht entsprechend mit Virus versetzten ("gespikten") Pools und die Auflösungstestung von vier der reaktiv getesteten Pools ausreichend. Zu diesem Zweck wird eine negative Humanplasmaprobe mit entsprechenden Referenzmaterialien versetzt um eine definierte Virusendkonzentration zu erhalten. Zur



Bildung eines Pools mit definierter Poolgröße wird die so hergestellte positive Einzelspende mit gleichen Teilen einer entsprechenden Anzahl von Negativspenden vermischt.

Zur Überwachung des NAT-Verfahrens ist in jedem Testdurchgang eine Laufkontrolle mitzuführen, die gemeinsam mit den Proben extrahiert und analysiert wird. Die Konzentration dieser Laufkontrolle richtet sich nach der gewählten Poolgröße und sollte die Mindestsensitivität bezogen auf die Einzelspende (siehe 2.2.a) für den jeweiligen Virusmarker widerspiegeln. Die maximale Konzentration der Laufkontrolle ergibt sich wie folgt:

- HCV-NAT: 5.000 IU HCV-RNA per mL/Poolgröße
- HIV-1-NAT: 10.000 IU HIV-1-RNA per mL/Poolgröße
- HEV-NAT: 2.000 IU HEV-RNA per mL/Poolgröße
- WNV-NAT: 250 Kopien WNV-RNA per mL/Poolgröße

Es wird empfohlen, eine Poolgröße zu wählen, bei der die adaptierte Laufkontrolle eine Konzentration aufweist, die vom Test noch sicher als reaktiv erkannt wird. Das Mitführen von Laufkontrollen bei In-Haus-Methoden und CE-zertifizierten NAT-Tests ist unter Punkt 3 beschrieben.

2.7. Validierung von zusätzlichen Teilschritten der Methode

a) Proben - Präanalytik

In der Literatur wird beschrieben, dass insbesondere bei Anwesenheit von Blutzellen virale RNA instabil sein kann. Daher sollte die Abtrennung der Zellen schnellstmöglich erfolgen. Die Packungsbeilage kommerzieller NAT-Tests beschreibt die entsprechenden Bedingungen. Bei In-Haus-Methoden soll die Vorgehensweise zur Präanalytik entsprechend festgelegt werden. Ergebnisse präanalytischer Studien von NAT-Laboratorien verschiedener transfusionsmedizinischer Einrichtungen belegen, dass die Separation innerhalb von 18 Stunden bei einer Lagerungstemperatur von +4°C zu keiner nachweisbaren Degradation der Nukleinsäure führt. Das Plasma oder Serum ist dann umgehend mit den denaturierenden Extraktionsagenzien zu versetzen. Rückstellproben sollten bis zum Abschluss der NAT möglichst keinen Einfrier-/Auftauzyklen unterzogen und nach Abschluss der NAT bei mindestens -30°C gelagert werden. Des Weiteren ist die Matrixäquivalenz bei Einsatz von Proben abweichend von der Packungsbeilage zu belegen.

b) Proben - Anreicherung

Wenn möglich, sollte eine Probenanreicherung vermieden werden.

Ist eine Probenanreicherung dennoch notwendig, sollte das Verfahren (z. B. Ultrazentrifugation) in der Validierungsphase auch mit serologisch negativen Proben (diagnostisches Fenster) und mit Proben unterschiedlicher Viruskonzentrationen validiert werden.

In der Routine ist die Effizienz der Ultrazentrifugation durch geeignete Kontrollen zu überprüfen.

c) Inhibition

Manche Proben enthalten Inhibitoren, die durch die Aufreinigung (Nukleinsäureextraktion) möglicherweise nicht komplett entfernt werden und dann z. B. auch in einem Pool die NAT inhibieren können. Eine mögliche Inhibition und ein daraus resultierendes falsch-negatives Ergebnis sollte routinemäßig erkannt werden.

Dazu ist eine interne Kontrolle mit jeder Probe mitzuführen, die im Reaktionsansatz koamplifiziert wird. Die interne Kontrolle durchläuft das gesamte NAT-Verfahren.

d) Detektion

Bei Benutzung eines selbstentwickelten Nachweissystems für amplifizierte Nukleinsäuren (z. B. ELISA-System, Fluoreszenzsystem) für die NAT-Auswertung ist durch Untersuchung von negativen (siehe Punkt 2.1) und positiven Proben (siehe Punkt 2.2) ein geeigneter Grenzwert zu definieren.

2.8. Mitgeltende Dokumente und Publikationen

Die folgenden Dokumente und Publikationen, die sich mit allgemeinen Anforderungen an qualitative Nachweismethoden oder NAT-Methoden befassen, stellen eine Grundlage für Validierungen dar:

- ICH Topic Q2 (R1) - Validation of Analytical Procedures: [Text and Methodology \(CPMP/ICH/381/95\)](#)
- Europäische Pharmakopöe: 2.6.21. Nucleic Acid Amplification Techniques
- [Richtlinie 98/79/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Oktober 1998](#) über In-vitro-Diagnostika. Amtsblatt der Europäischen Union L331 vom 07.12.1998
- [Entscheidung der Kommission vom 07. Mai 2002](#), 03. Februar 2009 und 27. November 2009 sowie Beschluss vom 20. Dezember 2011 über Gemeinsame Technische Spezifikationen für In-Vitro-Diagnostika (2002/364/EG). Amtsblatt der Europäischen Union L131 vom 16.05.2002, L39 vom 10.02.2009, L318 vom 04.12.2009 und L341 vom 22.12.2011
- Nübling CM, Chudy M, Löwer J. (1999). Validation of HCV-NAT and provisional experience in Germany with the application of HCV-NAT for blood screening. *Biologicals* 27, 291-294
- Chudy M, Hewlett I, Saldanha J, Bianco C, Conrad AJ, Gierman T, Heldebrant C, Rautmann GG, Roth WK, Stramer S (2003): Technical considerations for the performance of Nucleic acid Amplification Technology (NAT): The NAT Task Force Group. *Biologicals* 31(3):153-159
- Chudy M, Kress J, Halbauer J, Heiden M, Funk MB, Nübling CM (2014). Risk Minimization Measures for Blood Screening HIV-1 Nucleic Acid Amplification Techniques Assays in Germany. *Transfus Med Hemother.* 41 (1): 45-51



3. Spezifische Anforderungen an HCV-, HEV-, HIV-1- und WNV-NAT-Tests

NAT-Verfahren	Anforderungen
In-Haus-Methoden <i>Selbst hergestellte NAT-Tests und modifizierte CE-zertifizierte NAT-Tests (z. B. Änderung der Extraktionsmethode etc.)</i>	<p>Einzelspendentestung:</p> <ul style="list-style-type: none"> Validierung entsprechend den PEI-Empfehlungen Mitführen einer Laufkontrolle <p>Pooltestung:</p> <ul style="list-style-type: none"> Validierung entsprechend den PEI-Empfehlungen Poolgröße definieren (max. 96) Auflösungsalgorithmus beschreiben Testung 8 positiver Pools, davon 4 Pools auflösen Mitführen einer Laufkontrolle
CE – Non-Screening Test "Off-label-use" <i>CE-zertifizierter Test nach Herstellerangaben durchgeführt (geänderter Verwendungszweck)</i>	<p>Einzelspendentestung:</p> <ul style="list-style-type: none"> keine zusätzliche Validierung notwendig Mitführen einer Laufkontrolle, wenn keine Kitkontrolle vorgesehen <p>Pooltestung:</p> <ul style="list-style-type: none"> Poolgröße definieren (max. 96) Auflösungsalgorithmus beschreiben Testung 8 positiver Pools, davon 4 Pools auflösen¹ Mitführen einer Laufkontrolle Hochpositive Kitkontrolle ist entbehrlich
CE – Screening Test <i>CE-zertifizierter Test nach Herstellerangaben durchgeführt (Verwendungszweck: Screening)</i>	<p>Einzelspendentestung:</p> <ul style="list-style-type: none"> keine zusätzliche Validierung notwendig <p>Pooltestung (≤ 48 Spenden)^{2,3}:</p> <ul style="list-style-type: none"> Poolgröße definieren Auflösungsalgorithmus beschreiben keine zusätzliche Validierung notwendig <p>Pooltestung (> 48 Spenden)²:</p> <ul style="list-style-type: none"> Poolgröße definieren (max. 96) Auflösungsalgorithmus beschreiben Testung 4 positiver Pools, davon 2 Pools auflösen¹

¹Wenn für mehrere virale Marker Testplattform und Poolauflösungsalgorithmus identisch sind, reicht es aus, die Untersuchungen zur Poolauflösung exemplarisch an einem Marker durchzuführen.

²Für CE-zertifizierte Screening-Tests zum Nachweis von HEV- bzw. WNV-RNA ist zusätzlich eine Laufkontrolle mitzuführen, wenn deren HEV- bzw. WNV-RNA-Konzentration resultierend aus dem Quotienten der Nachweisgrenze bezogen auf die Einzelspende/gewählte Minipoolgröße unterhalb der dreifachen LOD des NAT-Tests liegt. Die Konzentration der Laufkontrolle ist auf die dreifache LOD des NAT-Tests einzustellen. Als zusätzliche Maßnahme werden periodisch mitlaufende Trendkontrollen empfohlen, die z. B. die einfache LOD-Konzentration enthalten. Für den cobas WNV Test und den Procleix WNV Assay ist die Poolgröße auf <20 begrenzt.

³Für CE-zertifizierte Screening-Tests zum Nachweis von WNV-RNA kann zunächst auch ohne Vorliegen eines Kontrollmaterials zur Überprüfung der Poolingstrategie und ohne das Mitführen einer zusätzlichen externen Laufkontrolle mit dem Spenderscreening begonnen werden.



4. Regelungen aus Stufenplänen

4.1. IVD-Spenderscreening (PEI-Stufenplan vom 07.01.2013)

Der Stufenplan regelt, welche Prüfverfahren (einschließlich NAT-Tests) für die Untersuchungen der Blut- und Stammzellspender auf die Infektionsmarker HIV, HBV, und HCV verwendet werden dürfen. Die Chargenkonsistenz dieser Test Reagenzien ist gewährleistet.

Für alle anderen NAT-Verfahren (z. B. HEV-NAT, WNV-NAT) obliegt die Überprüfung der Chargenkonsistenz durch den Anwender.

4.2. Für die **Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan (CAP/CTM)**-Tests der Firma Roche Diagnostics GmbH gelten folgende Regelungen:

CAP/CTM HIV-1 Test, v2.0:

Bei Verwendung des Tests für das Spenderscreening ist zu beachten, dass bei der Auswertung der Testergebnisse, analog zur Auflage des PEI vom 15.11.2005,

- a) der Kit-interne Quantifizierungs-Standard (QS) eine Mindestfluoreszenzintensität von 22 (statt bisher 20 für den CAP/CTM HIV-1 Test) aufweist und
- b) kein "cycle-threshold-value" (ct-Wert) für die HIV-1 RNA angezeigt wird.
- c) Die Auswertung der Ergebnisse ist durch Inaugenscheinnahme der Messkurven vorzunehmen, es muss weiterhin eine Archivierung der Verlaufskurven erfolgen. Die qualitative Untersuchung von Blutproben mit dem Ergebnis nicht nachweisbarer HIV-1 RNA und einer Fluoreszenzintensität des QS <22 ist deshalb bei Anwendung des neuen HIV-1 Testes, v2.0 als "invalid" zu interpretieren und die Testung ist zu wiederholen.

Achtung: Fluoreszenzwerte des Tests beziehen sich auf die "normalisierten Kurven".

CAP/CTM HCV Qualitative Test, v2.0 und CAP/CTM HCV Quantitative Test, v2.0:

Keine zusätzliche visuelle Kurvenauswertung notwendig.

5. Einreichung der Validierungsunterlagen

Die einzureichenden Unterlagen zur Validierung der NAT-Tests sollen neben einer detaillierten und nachvollziehbaren Beschreibung von Testaufbau, -ablauf, Reagenzien etc. die hier aufgeführten Anforderungen zur Validierung belegen. Es wird gebeten, die Dokumentation und die Rohdaten vorzugsweise in elektronischer Form einzureichen.

Die mit einem Zulassungsantrag oder mit einer Änderungsanzeige eingereichten Validierungsunterlagen sind Bestandteil des Zulassungsdossiers von Blutprodukten am Paul-Ehrlich-Institut.

Die Unterlagen zur Validierung und damit in Verbindung stehende Anfragen senden Sie bitte per E-Mail an transfusionsmedizin@pei.de.

Wir bitten um Angabe einer Kontaktperson für eventuelle Rückfragen.