

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

1 Hintergrund

Die NAT für das Spenderscreening besteht aus mehreren Teilschritten, von denen jeder einzelne die Effizienz und Qualität des Gesamtverfahrens beeinflussen kann.

- Abnahme, Transport, Vorbereitung und Lagerung der Proben (Präanalytik)
- evtl. Herstellung von "Pools"
- 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 gewählten Methoden für den beabsichtigten Zweck geeignet sind und die entsprechenden Anforderungen kontinuierlich erfüllen. Grundsätzlich können für das Spenderscreening folgende NAT-Verfahren verwendet werden:

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

Bei der Verwendung von kommerziellen NAT-Systemen sind Teilaspekte, die bereits durch den Hersteller validiert und gegenüber dem PEI belegt wurden, nicht mehr durch den Anwender zu validieren.

Werden CE-gekennzeichnete NAT-Tests, die nicht für das Spenderscreening evaluiert worden sind, streng nach der Herstellervorschrift durchgeführt (off-label-use), wie z. B. quantitative NAT-Systeme, muss der Anwender zusätzliche Untersuchungen durchführen, die die Tauglichkeit für das Spenderscreening belegen. Darunter fallen für die Spendeinrichtung spezifische Punkte, die nicht durch den IVD-Hersteller abgedeckt wurden, wie z. B. Festlegung des Ergebnisbefundes (reaktiv / nicht reaktiv), das Poolen, die Auflösungstestung von Pools und die Testsensitivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Poolgröße. Die Untersuchung von acht entsprechend mit Virus versetzten ("gespiketen") Pools und die Auflösungstestung von vier der reaktiv getesteten Pools werden hierbei als ausreichend angesehen. Entsprechende Run-Kontrollen sind mitzuführen (siehe 4.).

Der Einsatz von CE-gekennzeichneten Testsystemen, die für die Untersuchung von Blut- und Stammzellspendern entwickelt wurden, ist dem PEI mitzuteilen, nachdem sich der Anwender vergewissert hat, dass die in Deutschland geltenden Anforderungen an die Mindestempfindlichkeit erfüllt werden. Abweichende Regelungen sind im Anhang aufgeführt.

2 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](#)
- 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

3 Validierungsanforderungen

Bei NATs für das Spenderscreening sind für die Gesamtmethode folgende Validierungspunkte abzudecken bzw. im Routinebetrieb zu kontrollieren:

3.1 Spezifität

Bestimmung der Identität des Reaktionsproduktes, Ausschluss falsch-positiver Befunde

Die Spezifität einer NAT-Methode kann bereits im Vorfeld durch die Auswahl der Primer und Sonden sowie 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 positive Testproben 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.

3.2 Sensitivität

a) Analytische Nachweisgrenze

Die analytische Nachweisgrenze einer Methode, auch LOD (limit of detection) genannt, kann unterschiedlich definiert werden. Die PCR-Monographie der Europäischen Pharmakopöe, sowie die Gemeinsamen Technischen Spezifikationen für In-Vitro-Diagnostika der Direktive 98/79/EC definieren beispielsweise als "positiven Grenzwert" die Konzentration der Zielnukleinsäure, die in 95% der Experimente noch amplifizierbar/detektierbar ist.

Im Rahmen der Festlegung der viralen Nukleinsäure-Konzentration, die für das Spenderscreening in einer positiven Einzelspende detektiert werden muss (z. B. 5.000 IU/ml, basierend auf dem WHO-Standard HCV-RNA; 10.000 IU/ml HIV-1-RNA, basierend auf dem WHO-Standard HIV-1-RNA), 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) validiert, wobei jeder Verdünnungspunkt in 8 Replikaten analysiert werden sollte. Die Verdünnungsreihe sollte mindestens 5 (Verdünnungsfaktor 2) bzw. 3 (Verdünnungsfaktor halb-log zur Basis 10) Punkte oberhalb des positiven cut-off



Wertes (95%) umfassen. Die Berechnung des 95%-Wertes sollte mit geeigneten statistischen Verfahren, z. B. Probit-Analyse (für logarithmierte Dosiswerte), erfolgen.

Die festgelegten Nachweisgrenzen für HCV- und HIV-1-RNA im Spenderblut (siehe oben) sind für die bekannten HCV-Genotypen und HIV-1-Subtypen zu gewährleisten.

Die Konzentrationsangabe in IU/ml basiert auf der Kalibrierung mit den entsprechenden WHO-Standards. Manche Testhersteller geben aus historischen Gründen (z. B. quantitative HIV-1-NATs) die Konzentration in Kopien viraler Nukleinsäure/ml bzw. Genomäquivalenten/ml an. Die Packungsbeilage gibt hier den testspezifischen "Konversionsfaktor" IU zu Kopien an.

Die WHO-Standards sind erhältlich über das National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) in Großbritannien:

Website: www.nibsc.org

Email: standards@nibsc.org

Die lyophilisierten Standards werden allerdings nur in kleinen Mengen und in bestimmten Zeitabständen abgegeben, so dass die Herstellung oder der Bezug von Referenzpräparaten, die am WHO-Standard kalibriert wurden, unumgänglich ist.

Auch über das PEI können lyophilisierte Referenzpräparate für HCV-RNA, HIV-1-RNA und HBV-DNA bezogen werden, die gegen den jeweiligen WHO-Standard kalibriert wurden. Diese Materialien können für Validierungsstudien oder für die Herstellung von Kontrollen (siehe unten) eingesetzt werden. Auch ein Internationales Referenzpanel der WHO mit den verschiedenen HBV-Genotypen kann über das PEI bezogen werden. Datenblätter zu den PEI-Referenzpräparaten und anderen Präparaten können angefordert werden und sind auch auf der PEI-Website abgelegt:

Paul-Ehrlich-Institut, Abteilung Virologie, Fachgebiet Molekulare Virologie

Fax: +49 6103 77 1280

E-Mail: Sigrid.Hanitsch@pei.de; Ines.Amberg@pei.de oder Christine.Hanker-Dusel@pei.de

Webseite: www.pei.de/DE/infos/pu/referenzmaterial/referenzmaterial-node.html

b) Kontrollen

Die Nachweisgrenze wird durch den regelmäßigen Einsatz entsprechend niedrig eingestellter Positivkontrollen (Run-Kontrollen) kontrolliert, die zusammen mit den Proben aufgearbeitet werden. Run-Kontrollen 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 ("gespiketen") 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).

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

c) Inhibition

Manche Proben enthalten NAT-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) Genotypen, Subtypen

Durch die entsprechende Auswahl der Primer und Sonden ist eine Erkennung der bekannten Geno- und Subtypen zu gewährleisten. Diese Erkennung ist an typisierten Proben zu überprüfen, z. B.

- HCV-Genotypen Panel, zu beziehen über:
Institut für Virologie, Nationales Referenzzentrum für Hepatitis C
Universitätsklinikum Essen
Robert-Koch-Haus, Virchowstraße 179, 45147 Essen
E-Mail: stefan.ross@uni-due.de
- HIV-1-Subtypen Panel, zu beziehen über:
Virologisches Institut - Klinische und Molekulare Virologie
Universitätsklinikum Erlangen
Schlossgarten 4, 91054 Erlangen
E-Mail: nrzretro@viro.med.uni-erlangen.de
- WHO International Reference Panel for HIV-1 Subtypes, WHO International Reference Preparation for HIV-1 Circulating Recombinant Forms, HCV RNA Genotype Panel (non WHO Material) zu beziehen über:
NIBSC
Website: www.nibsc.org
Email: standards@nibsc.org
- WHO International Reference Panel for HBV Genotypes for NAT-based Assays (PEI Code 5086/08), zu beziehen über:
Paul-Ehrlich-Institut
Website: www.pei.de/EN/information/license-applicants/standard-and-referencematerials/who/who-biological-reference-materials-node.html
E-Mail: whoccivd@pei.de

3.3 Präzision

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 in den Routinebetrieb eingestreute Blindproben soll die Funktionsfähigkeit der Methode kontrolliert werden.

3.4 Reproduzierbarkeit

Die Übereinstimmung der Testergebnisse zwischen verschiedenen Labors wird anhand von Kontrollpanels überprüft, die von verschiedenen Anbietern erhältlich sind.

Die Teilnahme an Ringversuchen, die vom PEI für In-Haus hergestellte NATs organisiert werden, ist für entsprechende Anwender in Blut- und Stammzellspendeeinrichtungen obligatorisch. Darüber hinaus gibt es für alle Arten von NAT-Tests verschiedene Anbieter von Ringversuchen, z. B.

[Institut für Standardisierung und Dokumentation im Medizinischen Laboratorium e.V. \(Instand e.V.\)](#)

U Bieberstraße 20, 40223 Düsseldorf

E-Mail: instand@instand-ev.de

3.5 Robustheit

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 2b) 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.

Teilschritte der Methode

a) Proben

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. Des Weiteren belegen die Ergebnisse präanalytischer Studien von NAT-Laboratorien verschiedener transfusionsmedizinischer Einrichtungen, 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.

b) Anreicherung

Anreicherungsverfahren wie z. B. Ultrazentrifugation sollen in der Validierungsphase auch mit serologisch negativen Proben (diagnostisches Fenster) und mit Proben unterschiedlicher Viruskonzentrationen durchgespielt werden.

In der Routine soll die Effizienz der Ultrazentrifugation durch geeignete Kontrollen überprüft werden.

c) Extraktion

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 2a) können diese Punkte bereits teilweise abdecken.

d) Mögliche Fehlerrate des Gesamtsystems

Die Intra-Assay-Variabilität ist durch Amplifikation (mindestens 8 Ansätze) derselben extrahierten Nukleinsäure (s. o.) mit einer Charge von Reagenzien, die Inter-Assay-Variabilität durch wiederholte Amplifikation (8 Ansätze) dieser Probe mit verschiedenen Chargen von Reagenzien zu untersuchen. Die Untersuchungen zur Nachweisgrenze (Punkt 2a) können diese Punkte bereits teilweise abdecken.

e) 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 1) und positiven Proben (siehe Punkt 2) ein geeigneter Grenzwert zu definieren.



4 Spezifische Anforderungen an HCV- und HIV-1-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>	<ul style="list-style-type: none"> • Validierung entsprechend den PEI-Empfehlungen • Testung 8 positiver Pools, davon 4 Pools auflösen • Mitführen externer Run-Kontrollen
CE – Non-Screening Test "Off-label-use" <i>CE-zertifizierter Test nach Herstellerangaben durchgeführt (nur Verwendungszweck geändert)</i>	<p>Einzelspendentestung:</p> <ul style="list-style-type: none"> • keine zusätzliche Validierung notwendig <p>Pooltestung:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Poolgröße definieren • Auflösungsalgorithmus beschreiben • Testung 8 positiver Pools, davon 4 Pools auflösen • Mitführen externer Run-Kontrollen • Hoch-positive Kitkontrolle ist entbehrlich
CE – Screening Test <i>CE-zertifizierter Test nach Herstellerangaben durchgeführt</i>	<p>CE-Screening-Testsysteme:</p> <p>Roche Diagnostics GmbH: cobas TaqScreen MPX Test, cobas TaqScreen MPX Test, v2.0, cobas MPX (cobas 6800/8800)</p> <p>Hologic/Gen-Probe: Procleix Ultrio Assay, Procleix Ultrio Plus Assay, Procleix Ultrio Elite Assay</p> <p>Poolgröße ≤ 48:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Poolgröße definieren • Auflösungsalgorithmus beschreiben • Keine zusätzliche Validierung notwendig <p>Poolgröße > 48:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Poolgröße definieren (max. 96) • Auflösungsalgorithmus beschreiben • Testung 4 positiver Pools, davon 2 Pools auflösen



NAT-Verfahren	Anforderungen
CE – Screening Test <i>CE-zertifizierter Test nach Herstellerangaben durchgeführt</i>	<p>CE-Screening-Testsysteme, validiert für eine maximale Poolgröße von 96:</p> <p>GFE Blut mbH: Virus Screening PCR Kit, v1.3 DRK BSD BaWü-Hessen: DRK HCV PCR Kit v3.0, DRK HIV-1 PCR Kit v2.0</p> <p><u>Poolgröße ≤ 48:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Poolgröße definieren • Auflösungsalgorithmus beschreiben • Keine zusätzliche Validierung notwendig <p>Poolgröße > 48:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Poolgröße definieren (max. 96) • Auflösungsalgorithmus beschreiben • Testung 4 positiver Pools, davon 2 Pools auflösen

Testung positiver Pools und Poolauflösung

Versetzen einer negativen Humanplasmaprobe mit HCV und/oder HIV-1 zu einer definierten Endkonzentration von HCV- und/oder HIV-1-RNA (z. B. mit entsprechenden Referenzmaterialien). Bildung eines Pools bestehend aus gleichen Teilen der positiven Einzelspende und der entsprechenden Anzahl von Negativspenden.

Externe Run-Kontrollen:

Die maximale Konzentration der Run-Kontrolle 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

Es wird empfohlen, die Run-Kontrolle so einzustellen, dass deren Konzentration mindestens um den Faktor 3 der analytischen Testsensitivität (95% LOD) höher liegt.

Hinweis:

Die oben angegebenen Anforderungen sind Mindestanforderungen. Der Pharmazeutische Unternehmer bzw. das Testlabor kann weitere Untersuchungen durchführen und die Daten einreichen.

5 Regelungen aus Stufenplänen

Für die Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan (CAP/CTM)-Teste der Firma Roche Diagnostics GmbH gelten noch zusätzlich folgende Regelungen:

CAP/CTM HCV Test (entsprechend Stufenplanbescheid 15.11.2005):

Das Testsystem darf nur mit der Maßgabe verwendet werden, dass bei der Auswertung der Testergebnisse

1. der Kit-interne Quantifizierungs-Standard (QS) eine Mindestfluoreszenzintensität von 8 (acht) für HCV aufweist und
2. kein "cycle-threshold-value" (ct-Wert) für die HCV-RNA angezeigt wird.

3. Die Auswertung der Ergebnisse ist durch In-Augenscheinnahme der Messkurven vorzunehmen.

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,

1. der Kit-interne Quantifizierungs-Standard (QS) eine Mindestfluoreszenzintensität von 22 (statt bisher 20 für den CAP/CTM HIV-1 Test) aufweist und
2. kein "cycle-threshold-value" (ct-Wert) für die HIV-1 RNA angezeigt wird.
3. 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 für beide 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.

6 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. Die Dokumentation und die Rohdaten sollen vorzugsweise in elektronischer Form eingereicht werden.

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

Die Unterlagen sind einzureichen beim [Paul-Ehrlich-Institut](#) oder per E-Mail an transfusionsmedizin@pei.de.

Wir bitten um Angabe einer Kontaktperson für eventuelle Rückfragen.

7 Kontakt

Für Fragen zur Validierung:

Telefon: +49 6103 77-3304, -3307 oder -3300