

Richtlinien des FLI für die Zulassung von PCR-Diagnostika (PCR- Kit, PCR- und Extraktionskit)

Stand: Januar 2015

Kommerzielle Testsysteme zum spezifischen Nachweis von Nukleinsäuren von Tierseuchenerregern mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), reverser Transkriptase PCR (RT-PCR) oder mit anderen Verfahren der Nukleinsäure-Amplifikation und Detektion (z. B. NASBA) müssen in Deutschland vor der Abgabe an amtliche Untersuchungsstellen in gleicher Weise wie andere Diagnostika (z. B. ELISA) vom Friedrich-Loeffler-Institut (Zulassungsstelle Insel Riems) registriert, geprüft und zugelassen werden (§ 11 Abs. 2 TierGesG).

Im Rahmen der Zulassung wird neben der Prüfung der Herstellerunterlagen sowie der formalen Voraussetzungen auch eine Eignungsprüfung der PCR-Testsysteme in einem entsprechenden Prüflabor (z. B. Nationales Referenzlabor) vorgenommen. Bei zugelassenen Testsystemen werden regelmäßig Chargenprüfungen durchgeführt.

Um in die Zulassungsprüfung aufgenommen zu werden, müssen die PCR-Diagnostiksysteme zunächst folgende allgemeine Anforderungen erfüllen:

1. Klare Ausweisung des PCR-Diagnostikums als „**PCR-Kit**“ (alle wesentlichen Reagenzien und Arbeitsanweisungen für die PCR-Reaktion sind im Kit vorhanden und geprüft; das Extraktionsverfahren entspricht einem zugänglichen Standardverfahren und ist nicht Teil des Diagnostikums) oder als „**PCR- und Extraktionskit**“ (das Extraktionsverfahren ist Teil des Testsystems, alle wesentlichen Reagenzien und Arbeitsanweisungen für die PCR-Reaktion und für die Extraktion sind Bestandteil des Kits).
2. Das PCR-Diagnostikum enthält mindestens eine **positive Kontrolle** und gegebenenfalls auch negative Kontrollen. Zusätzlich beinhaltet das Diagnostikum mindestens eine Kontrolle, mit der gezeigt wird, dass die zu untersuchenden Proben die PCR nicht inhibieren (Inhibitionskontrolle). Empfehlenswert ist zusätzlich eine geeignete Extraktionskontrolle.
3. Die **Art und Beschaffenheit des zu verwendenden Probenmaterials** ist in der Gebrauchsinformation aufgeführt. Die Zulassung beschränkt sich auf dieses Probenmaterial. Sofern es sich um Erreger handelt, deren Nachweis bei verschiedenen Tierarten angestrebt wird, sind entsprechende Validierungsdaten für jede Tierart vorzulegen. Die Zulassung beschränkt sich nur auf die Tierarten, für die Validierungsdaten vorgelegt werden.
4. Der Test ist mit dem vorgesehenen Probenmaterial ausreichend **geprüft, standardisiert und validiert**. Hierzu sind aussagekräftige Unterlagen einzureichen. Empfehlenswert sind zudem Validierungsuntersuchungen von unabhängigen, externen Untersuchungseinrichtungen.
5. **Analytische und diagnostische Spezifität und Sensitivität** des PCR-Diagnostikums sind anzugeben und Daten hierzu in ausreichender Form, eventuell auch nach Rücksprache mit dem verantwortlichen Prüflabor, nachzuweisen. Eine angemessene **Sammlung an Validierungsdaten** ist zusammen mit dem Zulassungsantrag einzureichen.
 - a. **Analytische Sensitivität:** Feststellung des theoretischen Detektionslimits anhand von Plasmid-DNA oder *in vitro*-synthetisierter RNA (z. B. mit definierter Kopienzahl) oder bekannter Erregeranzahl. Hierbei sind eventuell entsprechende Standards des jeweiligen Prüflabors des FLI zu verwenden bzw. spezifische Vorgaben zu beachten.
 - b. **Analytische Spezifität:** Abgrenzung von genetisch verwandten Pathogenen. Angaben zur Spezies- oder Typspezifität müssen nachvollziehbar geprüft und belegt werden. Darüber hinaus sollte nachweislich durch einen Sequenzabgleich über Datenbanken (z.B. Genbank) die Sequenzinformation der eingesetzten Primer und Sonden auf Kreuzreaktivitäten überprüft werden.
 - c. **Diagnostische Sensitivität und Spezifität:** Als Richtlinie sollten mindestens Daten zu 150 unterschiedlichen positiven Einzelproben (auch schwach positive Proben, keine Replikate einiger weniger Referenzstämme) sowie zu mindestens 150 negativen

Proben vorgelegt werden. Zielt das Diagnostikum auf die Detektion eines breiten Erregerspektrums ab (z.B. alle Influenza A Viren oder alle Pestiviren), so sind Daten über einen aussagekräftigen Querschnitt dieses Spektrums nachzuweisen (z.B. Influenza A: ausreichend breite Basis von Vertretern aller derzeit 16 HA Subtypen). Die diagnostische Spezifität sollte auch an den entsprechenden negativen Probenmaterialien der relevanten Spezies getestet werden.

- d. **Testbereich:** Bei quantifizierenden Testsystemen ist der DNA/RNA-Standardbereich der jeweiligen Matrix, bei dem eine zuverlässige und stabile Quantifizierung möglich ist, anzugeben.
 - e. **Reproduzierbarkeit:** Die Vergleichbarkeit von Ergebnissen eines PCR-Laufes bzw. zwischen verschiedenen PCR-Läufen muss ausreichend dokumentiert werden.
6. Im Prüflabor nicht zur Verfügung stehende Geräte, die zur Durchführung der PCR-Diagnostik mit dem PCR-Diagnostikum notwendig sind (z. B. besondere *real-time* PCR Maschinen), müssen für den Zeitraum der Zulassungsuntersuchungen und Chargenprüfungen dem Prüflabor kostenfrei zur Verfügung gestellt werden.
 7. Für die Zulassungsuntersuchung sind ausreichend PCR-Diagnostika bereit zu stellen. Gefordert wird Material für mindestens 250 Einzelreaktionen.
 8. Nach erteilter Zulassung erfolgt eine Chargenprüfung der PCR-Diagnostika durch das FLI. Dazu sind der Zulassungsstelle Kits der entsprechenden Charge zur Verfügung zu stellen. Als Richtwert wird Material für mindestens 150 Einzelreaktionen gefordert.