

Verifiering/validering av metoder inom klinisk mikrobiologi

Torbjörn Kjerstadius

Klinisk mikrobiologi

Centralsjukhuset, Karlstad




Definition

- Validering eller verifiering av en analys/metod innebär:
 - att visa att analysen/metoden uppfyller krav enligt given specifikation (validering)
 - att analysen/metoden presterar enligt de specifikationer tillverkaren anger (verifiering)



Varför?

- För att säkerställa att analysen/metoden fungerar som förväntat
 - För att få erfarenhet av analysen/metoden
 - Krav för ackreditering av analysen/metoden
- 

Är det verkligen nödvändigt?

- Ja, om ditt laboratorium är ackrediterat enligt ISO/IEC 17025, ISO 15189 eller någon annan adekvat standard och analysen/metoden ska ackrediteras.
- Är det verkligen nödvändigt när analysen är CE- och IVD/IVDR-märkta eller FDA-godkända?
- I teorin ska inom EU CE- och IVD/IVDR räcka, men i praktiken inte!
 - Alla tillverkare är inte "ärliga" i sina underlag. T. ex kan patientpaneler vara selekterade för att passa analysen.
 - Din population skiljer sig från den population företaget använt (t ex. gällande seroprevalens, interagerande faktorer m. fl.).

Vad ska vi göra 1?

- Beror på analysens ursprung:
- Alternativ 1
 - Metod/procedur som är utvecklad och validerad för ett speciellt instrument/apparatur (avser även "kitbundna" manuella metoder). Leverantörens validering kan accepteras efter bedömning av leverantörens bifogade dokumentation.
 - I förekommande fall kan annan extern instans validering accepteras, t ex ett annat laboratoriums validering, efter bedömning av valideringsprotokollet.
 - Det finns referensmetodik angiven utifrån en standard, författning eller expertgrupp (t ex. FKM:s referensmetodik)
 - Här kan det räcka med en verifiering där man visar att analysen/metoden presterar enligt av tillverkaren redovisade prestanda eller enligt krav i standard/författning eller referensmetodik.

Röd text = hämtad ur SWEDAC DOC 01:55 2011-08-10 Utgåva 4

Vad ska vi göra2?

- Alternativ 2
- Metod som anpassas till ett instrument/mätstation och som avser vedertagen metod där fler än en leverantör alternativt egna program/moment/komponenter förekommer.
- Om validerade komponenter från flera leverantörer används åligger det laboratoriet att verifiera att **specificerade krav i metoden uppfylls i sin helhet**. Om komponenter inte är validerade ska laboratoriet genomföra en tillräckligt omfattande validering.
- Alternativ 3
- Tillämpning av en metod publicerad i vetenskaplig litteratur eller modifiering av tidigare ackrediterad metod. I detta fall måste valideringen/verifieringen vanligen ges en större omfattning än i fall 1 och 2.
- I de fall där metoden är allmänt etablerad inom professionen kan validering/verifiering ges en mindre omfattning (motsvarande den för nivå 1).

Vad ska vi göra 3?


- Alternativ 4
- Egenutvecklad metod. För egenutvecklade metoder krävs en utförlig validering.
- Här har laboratoriet tagit över tillverkarens ansvar och med nu gällande regler torde det innebära en validering enligt riktlinjer angivna för CE och IVD/IVDR.

Praktisk tillämpning

- Validering:
Egentillverkad. Kommersiell metod med egna modifieringar.
- Verifiering:
Tillverkaren eller annat “tillförlitligt” laboratorium har utfört en bra validering/verifiering.
- Korrelation:
 - Instrumentbyte till ett nytt likadant instrument eller ny version av instrument med samma reagens.
 - Mindre förändringar i sammansättning av reagens – t ex. ny tvättbuffert



Planera verifiering/validering

- Se vad andra gjort som publikationer, validerings-/verifieringsrapporter från andra (svenska) laboratorier/tillverkarens insert).
 - Välj alternativ enligt SWEDAC-dokumentet.
 - Planera provpaneler.
- 

Provpaneler 1

- Blodgivarpanel (serologi):
 - Finns rekommendation från läkemedelsverket, referensgrupp etc – följ denna!
 - Blodgivarscreening 200-400 blodgivare
 - Immunologiska analyser som ANA, ds nDNA: se KITM:s rekommendationer.
 - Används ofta för att bedöma specificitet (vid låg seroprevalens).
 - Inte någon stor vits vid serologier med hög seroprevalens som CMV IgG, VCA IgG, EBNA IgG, borrelia IgG i vissa områden.
- Panel av patientprov som har/inte har sjukdom är idealt. Kan ibland tillämpas för odlings- och molekylärdiagnostik men för serologi ofta svårt med undantag av kroniska infektioner som HIV, kronisk hepatit B/C.
- Panel med prov som är positiva i olika nivåer, gränsvärde eller negativa med nuvarande analys/metod.
- Problemprov/utmanande prov: falskt lågreaktiva i serologi, svårödlade bakterier etc.

Provpaneler 2

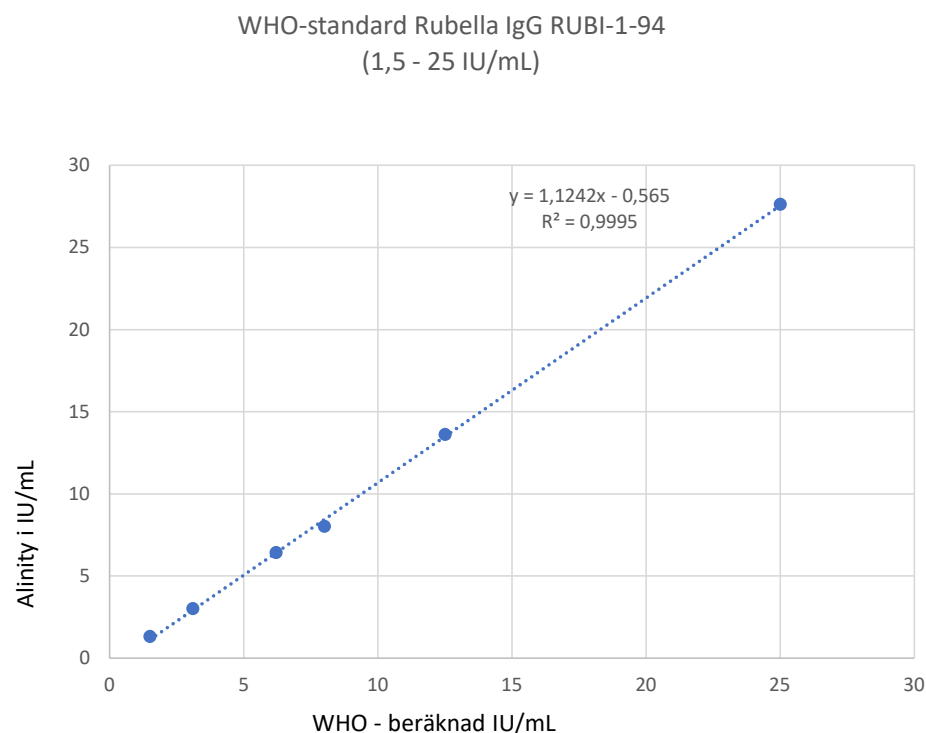
- Konsekutiva prover – är viktigt för att bedöma analysens prestanda i daglig rutin. Antalet inkluderade prov bestäms utifrån prevalens.
- Standarder (internationella, nationella). Finns för odling (typstammar) serologi och molekylär diagnostik.
- Prov från kvalitetssäkringsutskick. Finns sådana sparade är det bra att ha med ett antal av dem.
- I vissa fall finns bra kommersiella paneler, t ex serokonversions-paneler för t ex. HIV, paneler för HTLV.
- Paneler från andra laboratorier.
- Spädningar av (ofta starkt positiva) prov, dels för bedömning av detektionsnivå (odling, molekylär diagnostik, immundiffusions-/lateral flow-tester) dels för dynamik (serologi).

Provpaneler 3

- Bedöma interferens:
 - Serologi – spika positiva och negativa prov med t ex. triglycerider, hemoglobin, bilirubin och samkör ”ospikat” och spikat prov.
- Korsreaktivitet
 - Serologi: Panel med prov positiva för antikroppar som ofta korsreagerar, t ex CMV-, EBV-, Borrelia-IgM, RF-IgM, ANA samt närbesläktade agens.
 - Molekylär: Panel med smittämnen genetiskt närbesläktade med det agens som ska påvisas. Kan till viss del användas inom bakteriologi för t ex. agglutinationstester.
- CV-beräkning kitoberoende kontroller
- Carry over-panel

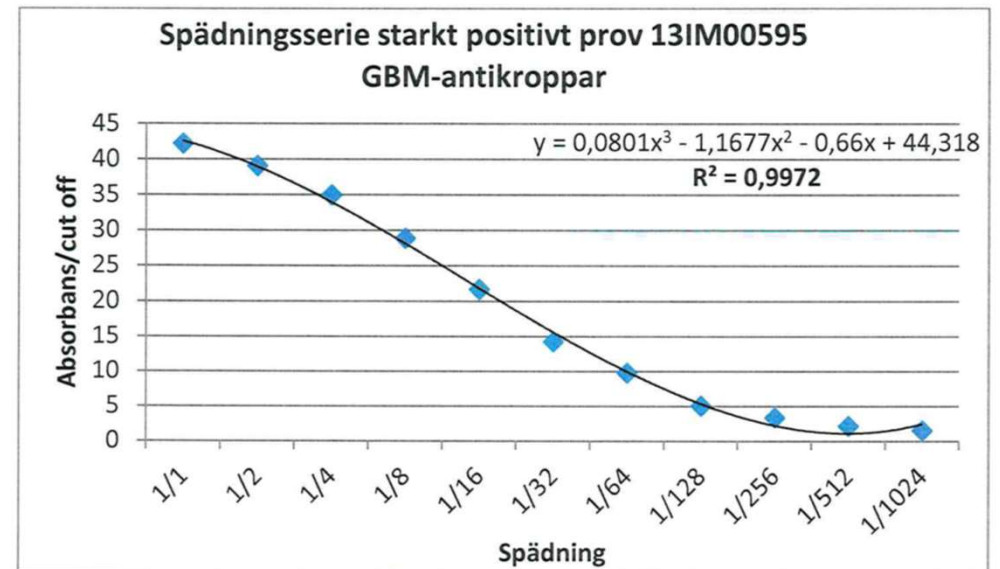
Vad ska utvärderas 1?

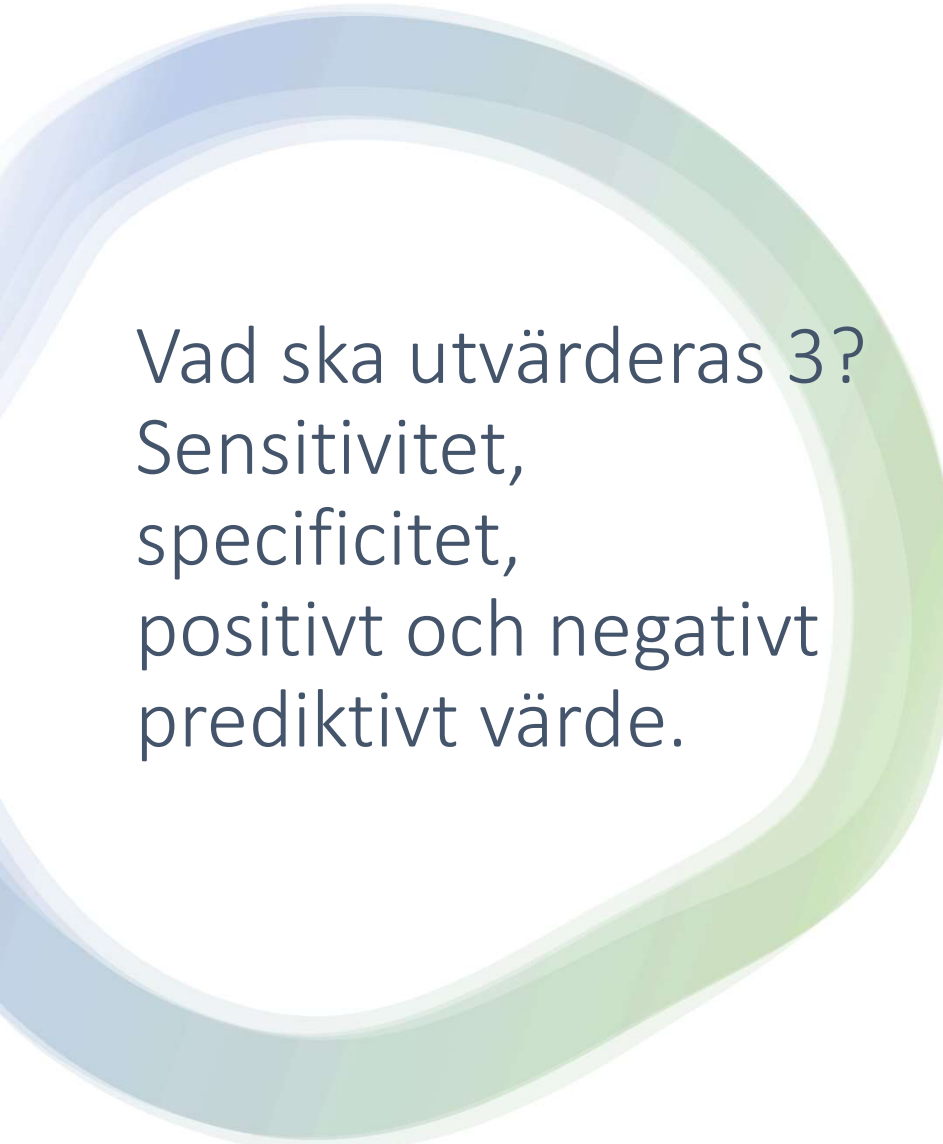
- Spårbarhet (till internationell eller annan standard).
- (Seroprevalens gäller serologi (blodgivare) om relevant. Jämför med litteratur/ andra lab. Hög seroprevalens kan medföra att värdet av ett positivt prov är ringa vid diagnostik av aktuell sjukdom).
- LoD (level of detection) kan ofta bedömas utifrån spädningsserie av standard.
- Cut off-nivå? Bedöms utifrån spädningsserie (standard eller starkt positivt prov).



Vad ska utvärderas 2? Linjäritet (serologi)

- Cut off-nivån i linjär fas är bra. Om den ligger i avplaningsfas kan en stor skillnad i koncentration ge obetydlig skillnad i resultat. Kan möjligen behövas ett gränsvärdesintervall.
- Ska skillnad i antikropps-nivå bedömas måste resultat ligga i analysens linjära fas (späd eventuellt).
- **Resultat över eller under den linjära fasen bör svaras > eller <.**





Vad ska utvärderas 3?
Sensitivitet,
specificitet,
positivt och negativt
prediktivt värde.

- Om panel med prov från kliniskt diagnosticerad sjukdom används kan klinisk sensitivitet och specificitet beräknas.
- Används paneler där man jämför med annan analys (blodgivare, positiv och negativ panel, konsekutiva prover): analytisk sensitivitet och specificitet.
- Värdefullt att också beräkna positivt och negativt prediktivt värde.
Ett högt negativt prediktivt värde innebär att man inte falskskyltar sjuka som friska!

Vad ska utvärderas 4a? Korsreaktivitet

- Korsreaktivitet
- Viktigt att känna till när man ska tolka resultat. Hög grad av korsreaktivitet ger sämre specificitet och påverkar analysens användbarhet.

Korsreaktivitet för 2 TBE-IgG-analyser

Reaktivitet	Antal	Enzygnost TBE-IgG (Siemens)		FSME IgG (Progen)	
		Positiv	Gränsvärde	Positiv	Gränsvärde
EBV IgG+IgM	5	4	-	4	-
CMV IgG+IgM	5	1	-	1	-
RF-IgM	5	2	-	2	-
ANA IgG	5	2	-	2	-
Gula febern IgG	10	3	-	5	-
Dengue IgG	10	5	-	8	-
Japansk encefalit IgG	10	6	3	10	-



Vad ska utvärderas 4b? Interferens

- Påverkar några substanser som hemoglobin, bilirubin, triglycerider testen?
- Om tillverkaren redovisar en sådan enligt gällande riktlinjer kan denna accepteras.

Vad ska utvärderas 5 Riktighet och precision



Riktighet

Här använder man till exempel prov från utskickspaneler. Hittar vi det som vi förväntas hitta?



Precision

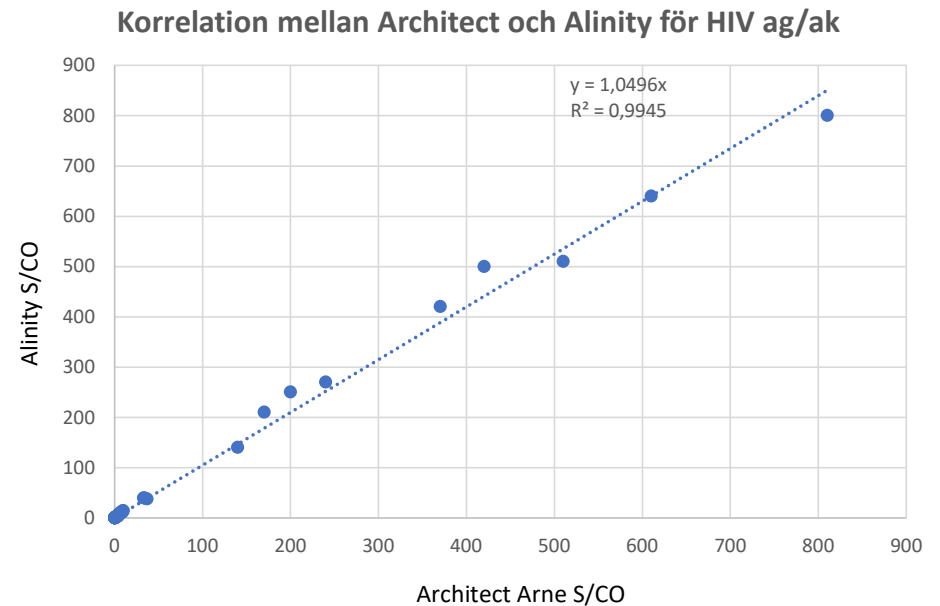
Hur bra fungerar analysen när vi analyserar den upprepat vid olika analysomgångar med olika instrument av samma typ med olika loter osv.

Anges med CV%. Finns olika riktlinjer för hur många, nivåer etc.

Har betydelse för till exempel att följa t ex. lotbyten, jämförelse mellan prov.

Vad ska utvärderas 6? Korrelation

- Om man jämför två analyser som ger numeriska värden.
- Om man jämför samma analys mellan två olika instrument.
- Finns mer utvecklad variant av analys (Bland Altman plot)



Vad ska utvärderas 7? Samstämmighet

- Samstämmighet/konkordans
- Vid jämförelse av analyser där inte korrelationsberäkning är möjlig (positiv/negativ odling, semikvantitativa tester osv) för att bedöma hur samstämmiga de kvalitativa resultaten är.
- Samstämmighet = antal prov där resultatet är detsamma/totala antalet prov.
- En del utesluter gränsvärden från beräkningen men då anser jag att man inte får en korrekt bild av hur väl analysen presterar.

Quantiferon Tb DiaSorin Liaison XL enligt tillverkaren 435 prov				
Cut off 0,35 (enligt tillverkaren)				
	Referenstest			
Liaison XL	Positiv	Negativ	Indeterminant	Samstämmighet
Positiv	148	9	0	
Neg	7	262	0	
Indet	0	0	9	96,3%

Karlstad samstämmighet 151 prov med i Sverige rekommenderade gränser						
	EIA					
Liaison	Positiv	Positivt gränsvärde	Negativt gränsvärde	Negativ	Indeterminant	Samstämmighet
Positiv	39	9				
Positivt gränsvärde		14	10			
Negativt gränsvärde		1	2	2		
Negativ				61	4	
Indeterminant	2				7	81,4%

Vad ska utvärderas 8? Diverse punkter

- Carry over? Finns risk för sådan t ex. fast pipett som tvättas av mellan proven (utan pipettspets som byts mellan varje prov). Förekommer i t ex. Architect-instrumenten och i Liason. Sällan av betydelse för serologiska resultat men kan påverka resultat om nukleinsyra-analyser (PCR) utförs på samma rör efter att det körts i instrumenten.
- Verifiering av interface – kontroll att data från instrument överförs korrekt till LIS och till journalsystem.

Skriva en rapport – några punkter

- SWEDAC ställer utifrån standard vissa krav:
- Plan ska finnas. Denna ska innehålla en beskrivning om varför validering/verifiering ska utföras, planerad omfattning och vilka krav som ska uppfyllas för godkännande (mål).
- I rapporten ska data och resultat presenteras, en sammanfattning och ett beslut redovisas.

Skriva rapport 2 – Exempel

- Visas separat.