

INDHOLDSFORTEGNELSE

1. FORORD.....	2
2. FORMÅL OG GYLDIGHEDSOMRÅDE	2
3. BEGREBER, DEFINITIONER OG HENVISNINGER.....	2
4. OMFANG.....	3
5. INDHOLD AF VALIDERINGSPLAN OG -RAPPORT	4
6. KVALITETSMÅL FOR ANALYSEMETODER I KLINISK BIOKEMI.....	4
7. FORHÅNDSVEDTAGELSER.....	5
8. METODEEGENSKABER FOR MÅLINGENS KVALITET	5
8.1 Metrologisk sporbarhed.....	5
8.2 Korrekthed og metodesammenligning	6
8.3 Måleinterval	6
8.4 Detektionsgrænse	6
8.5 Analytisk specificitet.....	7
8.6 Linearitet	7
8.7 Intermediær præcision.....	7
8.8 Robusthed.....	7
8.9 Afsmitning.....	7
8.10 Præanalytiske forhold.....	7
8.11 Måleusikkerhedsbudget.....	8
9. KONKLUSION.....	8
10. REFERENCER	8
11. IKRAFTTRÆDELSE	9

1. FORORD

Dokumentet er en omarbejdet version af den tidligere DANAK retningslinje RL6, som nu er udgået. Dokumentet kan betragtes som et hjælperedskab til validering af analysemetoder og anbefales af Dansk Selskab for Klinisk Biokemi (DSKB). DANAK har deltaget i bearbejdelsen og er af den holdning, at efterlevelse af denne vejledning svarer til kravene i akkrediteringsstandarderne ISO 17025 og ISO 15189.

2. FORMÅL OG GYLDIGHEDSOMRÅDE

Denne hjælpevejledning fastlægger en fortolkning af kravene i DS/EN ISO/IEC 17025:2005 og DS/EN ISO 15189:2008 for klinisk biokemiske laboratorier vedrørende methodedokumentering – herunder især laboratoriernes stillingtagen til nødvendig validering af anvendte analysemetoder, samt til vurdering af resultaterne af et sådant valideringsarbejde. Hjælpevejledningen bygger på den tidligere RL6 og er tilrettet med hjælp fra DANAK.

Analysemetoder, der omhandler nominalegenskaber, er ikke medtaget her.

3. BEGREBER, DEFINITIONER OG HENVISNINGER

Henvisninger til punkter i ISO 17025 og ISO 15189 er markeret med []. Henvisninger til litteraturreferencer er markeret med ().

ISO 17025 [5.4.5.1]: 'Validering bekræfter ved undersøgelse og tilvejebringelse af objektive vidnesbyrd, at de specielle krav til den givne anvendelse er opfyldt' (1).

ISO 17025 [5.4.5.2]: 'Laboratoriet skal validere ikke-standardiserede metoder, selvudviklede metoder, standardiserede metoder, der anvendes uden for deres tilsigtede anvendelsesområde, og ændringer af standardiserede metoder for at bekræfte, at metoderne er egnede til det givne formål. Valideringens omfang skal svare til, hvad der er nødvendigt for den konkrete anvendelse eller det aktuelle anvendelsesområde. Laboratoriet skal registrere de fundne resultater, proceduren, der er anvendt ved valideringen, samt en erklæring om, hvorvidt metoden er egnet til det givne formål.'

ISO 15189 [5.5.2]: 'Laboratoriet må kun benytte validerede procedurer til bekræftelse af, at undersøgelsesprocedurerne er egnede til det forudsatte formål. Valideringerne skal være tilstrækkelig omfattende til at opfylde behovet for den givne anvendelse eller det givne anvendelsesområde. Laboratoriet skal registrere de opnåede resultater og den procedure, der er anvendt ved valideringen.

De metoder og procedurer, som laboratoriet vælger at benytte, skal evalueres og konstateres at give tilfredsstillende resultater, inden de anvendes til medicinsk undersøgelse'.

I ISO 15189 anvendes begrebet undersøgelsesprocedure. I nærværende dokument anvendes i stedet den i klinisk biokemiske laboratorier ofte anvendte betegnelse *analysemetode*.

Som led i valideringen skal der udføres et estimat over den samlede måleusikkerhed knyttet til måleværdien, jvf. Pkt. 8.11. Denne usikkerhed, sammenholdt med de kliniske krav til anvendelsen af måleresultatet, indgår i grundlaget for beslutningen om at anvende metoden i rutineproduktion.

Som led i valideringen bør der også tages stilling til, hvilke referenceintervaller der kan anvendes sammen med de valgte analysemetoder (ISO 15189 [5.5.5])

4. OMFANG

I ISO 17025 [5.4.5.2] omtales standardmetoder og ikke-standardiserede metoder (1). Standardmetoder udføres efter anerkendte specifikationer og er færdigvaliderede. Laboratoriets eneste opgave er da kun at verificere, at metoden fungerer lokalt. Inden for klinisk biokemi findes ingen metoder, som kan betragtes som standardmetoder. De anvendte metoder er oftest videnskabeligt publicerede metoder, der er tilpasset af diagnostikproducenten eller af laboratoriet, eller de kan være udviklet af laboratoriet. Det kan også dreje sig om metoder, der anvendes uden for deres oprindelige applikationsområde eller er ændret på anden vis. Alle sådanne metoder skal valideres.

Valideringen eller dele af den kan være udført af diagnostikproducenten eller af andre laboratorier. Med ikrafttræden af "Bekendtgørelse om medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik" (3) ('IVD-direktivet') er diagnostikproducenten siden december 2003 lovmæssigt forpligtiget til at udføre en omfattende validering, hvorfor laboratoriets egne praktiske undersøgelser kan reduceres tilsvarende. Laboratoriet skal dog altid sikre, at metoden fungerer efter hensigten i eget laboratorium, hvilket betyder, at analysemetoden skal leve op til de, af laboratoriet, opstillede krav.

CE-mærkede analyser

CE-mærkede metoder er valideret af leverandøren til det af leverandøren opstillede formål.

Det er EA/DANAK's og DSKB's holdning, at for CE-mærkede analyser er det almindeligvis tilstrækkeligt at udføre en verifikation af, om leveret udstyr/analysemetoder lever op til de opstillede krav til analyserne.

I praksis kræves verifikation af følgende:

- Impræcision
- Korrekthed
- Måleusikkerhed
- Referenceintervaller, vejledende terapeutiske intervaller eller beslutningsgrænser

Bestemmelse af korrektheden bør udføres ved undersøgelse af sporbart materiale, eksempelvis eksternt kvalitetskontrolmateriale som HK fra DEKS, eller, hvis muligt, referencematerialer med velegnet matrix (f.eks. serum X eller CRM470): Hvis materialet ikke er tillagt en sand værdi, må konsensusværdien bruges som det bedste udtryk herfor. Korrektheden kan kun bedømmes ved sammenligning med tidligere metode, såfremt denne er en "sand og absolut" metode. I praksis betyder det, at den nye metodes korrekthed kun kan bedømmes ved sammenligning med tidligere metode, såfremt korrektheden for den tidligere metode er kendt og lever op til laboratoriets krav.

Laboratoriet skal opstille krav til analysemetodens måleusikkerhed og estimere dens størrelse på kvantitative analysemetoder (4). Estimatet bør så vidt muligt indeholde den intermediære impræcision beregnet over så lang tid, at der indgår dag til dag variation, flere apparater, reagenslot skift og kalibreringer. Desuden kan firmaets oplyste usikkerhed på kalibratoren inkluderes. Man bør angive en ekspanderet måleusikkerhed med en dækningsfaktor på 2.

Andre faktorer bør inkluderes i måleusikkerheden, såfremt usikkerhedsbidraget vurderes til at være af betydning. Hvis ønsket kan præanalytisk usikkerhed estimeres ud fra "Blodprøvetagning som kilde til præanalytisk variation"(5).

Test for evt. skred bør udføres med patientprøver sammenlignet med tidligere eller tilsvarende analysemetode udført andetsteds (viser at metoden lever op til klinisk anvendelighed) og indgår i bedømmelsen af det anvendte referenceinterval.

Inspiration til verifikation kan hentes på The Association for Clinical Biochemistry's hjemmeside (<http://www.acb.org.uk/An%20Ver/Measurement1.asp>), hvor der også findes færdige regneark til at løse opgaven.

Validerings/verifikationsproceduren for CE-mærkede analyser er således væsentlig mindre omfattende end fremgangsmåden ved ikke-CE-mærkede analysemetoder. DSKB anbefaler imidlertid altid, at der foretages en grundig vurdering af mulige analyser før indkøb mhp. om de er velegnede til at løse de kliniske problemstillinger i dagligdagen. Dette kan eksempelvis gøres ved at vurdere analyserne ud fra oplysninger fra kolleger, eksterne kvalitetskontrol-udsendelser eller oplysninger fra leverandøren. Der bør særligt lægges vægt på impræcision, korrekthed samt måleområder, og om der findes formelle krav til en given analysemetode.

Ikke CE-mærkede analyser

For analyser, der ikke er CE-mærkede, skal der udføres en egentlig validering, se nedenfor. Dette gælder også såfremt en CE-mærkning brydes i anvendelsen af en egentlig CE-mærket analysemetode, eksempelvis ved anvendelse af kit på andet instrument/platform end valideret af producenten.

5. INDHOLD AF VALIDERINGSPLAN OG -RAPPORT

I ISO 17025 [5.4.5.2] anføres, at 'Valideringens omfang skal svare til, hvad der er nødvendigt for den konkrete anvendelse eller det aktuelle anvendelsesområde' (1). Det anbefales, at der udarbejdes en valideringsplan (eller -protokol) med udgangspunkt i formålet med målingen og en beskrivelse af de relevante kvalitetsmål (se nedenfor).

En valideringsplan eller protokol vil omfatte en detaljeret beskrivelse af, hvordan relevante metodeegenskaber (se nedenfor) planlægges undersøgt, f.eks. ved fremskaffelse af dokumentation fra diagnostikproducenten, udførelse af undersøgelser i eget laboratorium, videnskabelig litteratur m.v. Efterfølgende frembringer laboratoriet dokumentation for: Specificerede kvalitetsmål, metodens egenskaber, og hvorvidt metoden tilfredsstillende kvalitetsmålene eller populært sagt: Hvor god skal metoden være, hvor god er den, og er det godt nok? Nedenfor er opstillet en række kvalitetsmål og metode-egenskaber for klinisk biokemiske analysemetoder.

Det anbefales, at de praktiske undersøgelser afsluttes med en valideringsrapport, der indeholder plan eller protokol, bearbejdede data samt konklusioner. Alternativt kan man anvende skemaet "Erklæring om validitet af metoden til bestemmelse af system, komponent, egenskabsart", som findes på www.danak.dk under Ekstranet.

Under alle omstændigheder skal valideringsproceduren afsluttes med en dokumenteret stillingtagen til, om planens mål er nået, og konklusioner om, hvorvidt analysemetoden er egnet til det givne formål.

6. KVALITETSMÅL FOR ANALYSEMETODER I KLINISK BIOKEMI

Nedenfor er i ikke-prioriteret rækkefølge angivet et sæt modeller eller komponenter til at fastsætte specifikationer for analytisk kvalitet (6,7). En så høj grad af – og niveau for – opfyldelse som muligt bør tilstræbes.

Kvalitetsmål sat af:

- Myndigheder.
- Organisationer, der udbyder præstationsprøvningsprogrammer (ekstern kvalitetsvurdering).

- Klinikere, subsidiært laboratoriets ledelse.

Publicerede anbefalinger:

- Fra nationale eller internationale ekspertgrupper.
- Lokale ekspertgrupper.

Kvalitetsmål ud fra aktuel 'state of the art':

- Data fra ekstern kvalitetsvurdering.
- Data fra nylige publikationer.

Evaluering af analysekvalitetens indvirkning på kliniske beslutninger generelt:

- Data baseret på biologisk variation, især den intraindividuelle.
- Data baseret på klinikernes vurdering.

Evaluering af analysekvalitetens indvirkning på specifikke kliniske beslutninger, baseret på studier af det endelige kliniske resultat ('clinical outcome').

7. FORHÅNDSVEDTAGELSER

Inden den praktiske del af valideringen påbegyndes, kan det være hensigtsmæssigt at fastlægge og beskrive nedenstående, der under alle omstændigheder skal dokumenteres:

- Analysens/metodens navn (System—Komponent; kvantitetsart), enhed (hvis relevant) samt evt. IU-PAC / IFCC / DNK-kode.
- Apparatur/udstyr.
- Miljøfaktorer (f.eks. temperatur, fugtighed, krav i forbindelse med DNA-undersøgelser).
- Patientprøver, kontrolmateriale, dvs. korrekthedskontrolmateriale, præcisionskontrolmateriale, m.m.
- Kalibrator.
- Acceptgrænser for den maksimalt tilladelige kombinerede standardmåleusikkerhed, jf. måleusikkerhedsbudget, punkt 8.11.
- Kravspecifikationer fra rekvirenterne.
- Biologisk referenceinterval (kilde samt vurdering af intervallet i forhold til egen population og metode).
- Sikkerhed og miljø.

8. METODEEGENSKABER FOR MÅLINGENS KVALITET

Der kan ikke angives en fast procedure for alle analysemetoder, i stedet må valg af metodeegenskaber vurderes fra analysemetode til analysemetode. En række metodeegenskaber er omtalt i ISO 17025 [5.4.5.3] og ISO 15189 [5.5.3] – og ved udarbejdelse af valideringsplanen udvælges, suppleres og vægtes disse efter behov og relevans.

8.1 Metrologisk sporbarhed

Definition: Egenskab hos et måleresultat eller værdien for en normal (målestandard), hvorigennem måleresultatet eller værdien kan relateres til givne referencer, sædvanligvis nationale eller internationale normaler, gennem en ubrudt kæde af sammenligninger, der alle har en oplyst usikkerhed (8,9).

Toppen af kalibreringshierarkiet skal angives. Dette hierarki vil oftest starte med en SI-enhed eller anden enhed og/eller en metode og/eller kalibrator og evt. gå gennem flere lignende lag til rutineanalysemetoden og resultatet.

8.2 Korrekthed og metodesammenligning

Definition af korrekthed: Grad af overensstemmelse mellem middelværdien for en stor serie af måleresultater og en accepteret referenceværdi (10).

Metodens korrekthed kan vurderes ved:

- analysering af certificeret korrekthedsmateriale eller lignende
- genfindingsforsøg
- sammenligning med andre laboratorier, der anvender samme eller anden metode. Den metode, der sammenlignes med, bør være en anerkendt, veldokumenteret metode, og prøvematerialet bør så vidt muligt være patientprøver.

Identificeres en klinisk betydende bias, skal der tages stilling til eventuelle forholdsregler inklusiv korrektion.

8.3 Måleinterval

Definition: Et lukket interval af mulige måleværdier, der er tilladt med en analysemetode, er afgrænset af den nedre målegrænse og den øvre målegrænse, og som har en angivet maksimal måleusikkerhed (modificeret efter 9).

Måleintervallet må være passende i forhold til klinikernes behov. I praksis fremkommer måleområdet ofte som et primært måleinterval – dækket af kalibreringskurven – og et udvidet måleinterval, der fremkommer ved manuel eller maskinel fortynding, hhv. opkoncentrering af prøvematerialet. I disse tilfælde skal det dokumenteres ved målinger inkl. kalibrering også i det udvidede område, at måleværdierne har en usikkerhed mindre end den maksimale værdi. Den funktionelle sensitivitet (defineret som CV ved intermediær præcisionsundersøgelse på f.eks. mindre end 20%) kan indgå i fastsættelse af nedre ende af måleområdet.

For metoder, hvortil anvendes CE-mærkede reagenser og kalibratorer, er producenten lovmæssigt forpligtiget til at angive måleintervallet og den tilhørende maksimale måleusikkerhed.

8.4 Detektionsgrænse

Definition: Måleresultat med en given måleprocedure, som er signifikant forskellig fra 0, for hvilket sandsynlighed for et analytisk falsk negativt resultat er β , givet sandsynligheden α for et falsk positivt resultat (11).

Detektionsgrænsen bestemmes – hvis det er relevant – ved gentagne målinger på patientprøver med meget lav måleværdi, subsidiært ved gentagne målinger på nul-kalibratoren. Koncentrationen svarende til målesignalets middelværdi + 5SD vil være et praktisk anvendeligt mål for detektionsgrænsen, som den er defineret ovenfor.

8.5 Analytisk specificitet

Definition: Analysemetodens evne til alene at måle målestørrelsen (modificeret efter 9).

Materialer med kendt indhold af beslægtede stoffer (krydsreaktionsforsøg) eller potentielt interfererende stoffer (tilsætningsforsøg) kan testes.

8.6 Linearitet

Definition: Direkte proportionalitet mellem måleværdi og værdi af målestørrelsen inden for måleintervallet (12).

Linearitet kan f.eks. valideres ved at anvende fortyndingsrækker fremstillet af prøver med kendte koncentrationer nær øvre, hhv. nedre målegrænse og blandet i forskellige forhold.

8.7 Intermediær præcision

Definition: Grad af overensstemmelse mellem uafhængige måleresultater, opnået med samme analysemetode på identisk prøvemateriale i samme laboratorium, men angivet under forskellige målebetingelser (13).

Den intermediære præcision bør estimeres ved repræsentative koncentrationer inden for måleintervallet. Koncentrationer i nærheden af kliniske beslutningsgrænser er specielt vigtige. Undersøgelserne kan foretages på patientprøver eller præcisionskontrolmateriale. Det er væsentligt, at undersøgelserne, for at kunne være repræsentative, skal foregå over et længere tidsinterval for at få vigtige elementer med i dag-til-dag variationen. Hvis flere instrumenter og/eller operatører anvendes valgfrit, skal disse variationskilder inkluderes.

8.8 Robusthed

Ved validering af en analysemetodes robusthed er det vigtigt at fremkalde ændringer i ydre forhold, som kan tænkes at have indflydelse på målingerne – f.eks. skift af reagenslot og kalibratorlot, temperatur og operatør. Størrelsen af evt. observerede afvigelser bør angives, men i praksis vil en fuldstændig vurdering af metodens robusthed ikke kunne nås inden for den tidsperiode, en validering sædvanligvis omfatter. Er analysemetoden CE-mærket i overensstemmelse med 'IVD-direktivet' (som en del af et system til in vitro-diagnostik), bør validering af robusthed kunne baseres på diagnostikproducentens oplysninger.

8.9 Afsmitning

Afsmitning kan deles i reagensafsmitning og prøveafsmitning. Reagensafsmitning ses især ved 'random access' udstyr, og vil ofte være beskrevet af diagnostikproducenten. På grund af de mange kombinationsmuligheder bliver denne type afsmitning dog tit først opdaget, når apparaturet er taget i anvendelse i daglig drift. Prøveafsmitning ses især ved batch-analysering og kan undersøges ved at måle patientprøver med lave og høje koncentrationer i defineret rækkefølge.

8.10 Præanalytiske forhold

Valideringen kan også omfatte præanalytiske forhold, der kan have indflydelse på måleresultaterne, f.eks. patientforberedelse, prøvetagning, prøvehåndtering, opbevaring og transport.

8.11 Måleusikkerhedsbudget

Usikkerhedsbudgettets formål er at orientere brugerne om den samlede måleusikkerhed for en given værdi samt at vise laboratoriet, hvor meget hver faktor bidrager til den samlede usikkerhed og dermed fokusområde for forbedring af den samlede kvalitet.

Usikkerhedsbudgettet skal omfatte alle kendte betydende bidrag til usikkerheden. Disse kan med fordel grupperes for at gøre beregningen simplere (4,14). Almindeligvis vil følgende elementer være til stede:

- 1) Usikkerhedskomponenter ved præanalytiske forhold.
- 2) Usikkerheden på bestemmelse (tilskrivelse) af kalibratorens værdi.
- 3) Usikkerhed på bias-korrektioner.
- 4) Usikkerheden på selve målingen (sædvanligvis den intermediære præcision).

Budgetterne bør, såfremt der ikke på overkommelig vis kan etableres eksperimentelle data, baseres på valide skøn.

Usikkerhed fra så mange betydende faktorer som muligt skal være indeholdt i usikkerhedsbudgettet. I praksis mangler der ofte gode data for usikkerhedskomponenter ved præanalytiske forhold, men hvis ønsket kan præanalytisk usikkerhed estimeres ud fra "Blodprøvetagning som kilde til præanalytisk variation" (5).

DANAK finder det derfor indtil videre tilstrækkeligt, at usikkerhedsbudgetter kun dækker punkterne 2, 3 og 4 i de tilfælde, hvor pålidelige data for usikkerheden for de præanalytiske forhold ikke er let tilgængelige.

Den intraindividuelle biologiske variation (15) kan være relevant ved vurdering af måleresultatet, men kan opgives særskilt til klinikerne. Det skal dog bemærkes, at tilgængelige tal for intraindividuel biologisk variation kun dækker raske individer, og det er ofte uklart, om prøvetagningsusikkerhed indgår i tallene.

9. KONKLUSION

Valideringen afsluttes med en vurdering af resultaterne og en konklusion om, hvorvidt metoden kan godkendes til brug i laboratoriet.

10. REFERENCER

1. DS/EN ISO/IEC 17025:2005: Generelle krav til prøvnings- og kalibreringslaboratoriernes kompetence.
2. DS/EN ISO 15189:2008: Medicinske laboratorier – Særlige krav til kvalitet og kompetence.
3. Bekendtgørelse om medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik. BEK nr. 1269 af 12/12/2005.
4. Akkrediteringsbestemmelse 13, www.danak.dk.
5. Gerdes U. Blodprøvetagning som kilde til præanalytisk variation. *Klinisk Biokemi i Norden* 2003;15(4):14-16.
6. Kenny D, Fraser CG, Petersen PH, Kallner A. Consensus agreement. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:585.
7. NA Dok. nr. 48a *Klinisk Kjemisk*; 2001.
8. DS:2344:1995: Metrologi, terminologi – Grundlæggende og generelle begreber (6.12).

9. Dybkær R. Vocabulary for Use in Measurement Procedures and Description of Reference Materials in Laboratory Medicine. *Eur J Chem Clin Biochem* 1997;35(2):141-173.
10. ISO 3534-1: 2006: Statistics – Vocabulary and symbols – Part 1: Probability and general statistical terms (3.12).
11. DS/ISO 11843-1: 2003: Detektionsevne – Del 1: Termer og definitioner.
12. Egen definition.
13. DS/ISO standard 5725-2: 1995: Nøjagtighed (korrekthed og præcision) af målemetoder og resultater. Del 2: Grundlæggende metode til bestemmelse af repeterbarhed og reproducerbarhed for en standardiseret målemetode.
14. Eurachem CITAC: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2. edition, 2000.
15. Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Current databases on biologic variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491-500 (med tilhørende online version og opdatering af databasen på <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>).

11. IKRAFTTRÆDELSE

15. oktober 2010.