

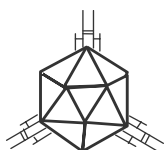
KVALITETSKONTROLL AV SEROLOGISKE ANALYSER

**Virologisk-serologisk
strategimøte 2001**

1. november 2001

**Oppsummering med anbefalinger
og
forelesningssammendrag**

**Redaktører:
Pål A. Jenum
Gunnar Haukenes
Gunnar Skov Simonsen**



**REFERANSEGRUPPE
FOR EKSTERN KVALITETSSIKRING
I VIROLOGI OG SEROLOGI**

KVALITETSKONTROLL AV SEROLOGISKE ANALYSER

**Virologisk-serologisk
strategimøte 2001**

2. november 2001

**Oppsummering med anbefalinger
og
forelesningssammendrag**

**Redaktører:
Pål A. Jenum
Gunnar Haukenes
Gunnar Skov Simonsen**

1 Innholdsfortegnelse

1	Innholdsfortegnelse	4
2	Oppsummering og anbefalinger	6
2.1	Kvalitetskontroll av serologiske antistoffanalyser er viktig	6
2.2	Alle medisinsk mikrobiologiske laboratorier skal ha et kvalitetssystem	6
2.3	Teknisk apparatur skal kalibreres og kontrolleres.....	6
2.4	Nye serologiske testsystemer skal valideres	7
2.5	Ethvert testsystem må ha relevante kit-avhengige kontroller.	7
2.6	Ethvert testsystem må ha relevante kit-uavhengige kontroller (driftskontroller).....	7
2.7	Alle analyser bør omfattes av et eksternt kvalitetskontrollprogram.	8
2.8	Analyseresultatene må vurderes i relasjon til testsystemet	8
2.9	Trouble-shooting	9
2.10	Om tolking og rapportering.....	9

FORELESNINGSSAMMENDRAG

3	Hvilken plass har antistoffpåvisning i mikrobiologisk diagnostikk i dag?	10
3.1	Noen fordeler ved serologisk diagnostikk.....	10
3.2	Noen ulemper ved serologisk diagnostikk	10
3.3	Trender	10
4	Oversikt og utvalg	12
4.1	Kvalitetskontroll – hva omfattes?	12
4.2	Grensesnitt mot akkreditering	12
4.3	ISO 17025	12
4.4	Sektorkomiteé P8	12
4.5	Temaer.....	12
4.6	Målsetning.....	13
5	Hva kreves av produsenter av kommersielle testsett?.....	13
5.1	Diskusjonsinnlegg	13
6	Kontrollrutiner for teknisk apparatur	1
6.1	Generelt	1
6.2	Kalibrering	1
6.3	Momenter ved eksternt bedømmelse.....	3
7	Noen aktuelle problemstillinger ved etablering av nytt testsystem i serologi.....	3
7.1	Innledning.....	3
7.2	Faglig dokumentasjon	4
7.3	Praktiske forhold	4
7.4	Forslag til valideringskrav.....	4
7.5	Sammenfatning.....	4
8	Kit-avhengige kontroller	5
8.1	Inndeling og funksjon.....	5
9	Ekstern kvalitetskontroll	5
9.1	Generelt	5
9.2	Akkreditering	6
9.3	Ringtester	7
9.4	Tanker om utviklingen de neste 5 år	8
9.5	”Nettverk” for forbedring og kontroll av kvalitet i Norge	8

10	Bruk av kit-uavhengige kontroller i serologiske analyser.....	9
10.1	Valg av kontroller.....	9
10.2	Antall kontrollprøver.....	9
10.3	Reaktiviteten av kontrollene.....	9
10.4	Metoder for løpende monitorering.....	9
10.5	Alarmgrenser og aksjonsgrenser.....	9
10.6	Avviksbehandling.....	10
11	Kritisk blikk på analyse-tallverdiene.....	10
11.1	Titreringsmetoder.....	10
11.2	Enzymmerkingsmetoder.....	11
11.3	Andre metoder.....	11
11.4	Fabrikantens angivelser.....	12
11.5	Spørsmål.....	12
12	Vurdering av serologiske analyseresultater i diagnostikken: Trouble-shooting.....	12
12.1	Generelt.....	12
12.2	Feilkilder før testing.....	12
12.3	Feilkilder ved serologiske analyser.....	13
12.4	Supplerende tester.....	14
12.5	Instrumenter.....	14
12.6	Konklusjoner.....	15
13	Tolkning og rapportering.....	15
13.1	Rapporten.....	15
13.2	Tolkning og kommentarer.....	15
13.3	Spørsmål.....	16
13.4	Kasuistikkar.....	18
13.5	Oppsummering av svar på utsende kasuistikkar.....	19

2 Oppsummering og anbefalinger

Hensikten med strategimøtet for ”Kvalitetskontroll av serologiske analyser” har vært å sette fokus på hvilke hovedelementer som er av betydning for kvaliteten på de resultatene vi gir ut og som til syvende og sist danner grunnlag for diagnose, behandling og oppfølging av pasientene. Samtidig var ønsket å gi råd om hvordan kvaliteten på hvert enkelt av disse elementene kan sikres. Sammendraget er denne gangen ikke et resultat av formelt uttrykt enighet på hvert punkt, men et kondensat av de ulike presentasjonene som uttrykker viktige forhold og betingelser forbundet med god kvalitet. Håpet er at dette kan danne et grunnlag for kvalitetsforbedring ved de medisinsk mikrobiologiske laboratoriene.

2.1 Kvalitetskontroll av serologiske antistoffanalyser er viktig

Antistoffanalyser i serum har en fremtredende plass innen mikrobiologisk diagnostikk og utredning av immunstatus. Det er enkelt å fremskaffe veldefinert prøvemateriale som egner seg for automatisert analyse i kommersielle formater. Det er også en fordel at materialet lar seg oppbevare for videre undersøkelser på et senere tidspunkt. Antistoffundersøkelser kan gi viktig informasjon i tillegg til undersøkelser for påvisning av infeksjøs agens. For noen infeksjonssykdommer er antistoffpåvisning den eneste muligheten for spesifikk diagnostikk. Hovedproblemet med antistoffdiagnostikk er at man ikke påviser den sykdomsfremkallende agens, men derimot vertens immunrespons som kan komme sent i forløpet. Serologiske antistoffundersøkelser vil også i fremtiden være et viktig diagnostisk verktøy. Det er derfor nødvendig å sikre best mulig kvalitet av slike analyser.

2.2 Alle medisinsk mikrobiologiske laboratorier skal ha et kvalitetssystem

Alle medisinsk mikrobiologiske laboratorier skal ha et kvalitetssystem. Dette skal også omfatte antistoffanalyser. Ansvar for kvaliteten ligger hos laboratoriets ledelse. Den internasjonale standarden ISO 17025 benyttes av Norsk Akkreditering (NA) for objektiv vurdering av laboratorienes kvalitetssystemer. På en rekke områder er det imidlertid uklart hvordan standarden skal tolkes for medisinsk mikrobiologiske laboratorier. NA har derfor opprettet Sektorgruppe P8 som fremlegger en rapport om disse forholdene i februar 2002. Også medisinsk mikrobiologiske laboratorier som velger ikke å søke akkreditering, bør forholde seg til kravene i ISO 17025.

Høsten 2001 implementerte Norge EU's direktiv om *in vitro* diagnostika (IVD MD direktiv 98/79/EC 27.10.1998). Direktivet angir hvilke essensielle krav som stilles til produkter som betingelse for at de skal kunne markedsføres innen EØS-området, og angir forskjellige prosedyrer for å oppnå samsvar med kravene som stilles. Produktene som oppfyller kravene i direktivet vil kunne få et CE-merke. Det er foreløpig uklart hvilke praktiske virkninger IVD-direktivet, vil få for den diagnostiske virksomheten ved norske medisinsk mikrobiologiske laboratorier.

2.3 Teknisk apparatur skal kalibreres og kontrolleres

En forutsetning for god kvalitetskontroll er at det finnes gode rutiner for kalibrering og kontroll av teknisk apparatur. Kalibrering er en fastlegging av instrumentets måleverdi i forhold til en overordnet standard, dvs. etablering av sporbarhet. Kontroll av utstyret innebærer at man regelmessig avleser og loggfører utstyrets målefunksjon.

Et fullverdig kontrollprogram for teknisk apparatur omfatter alle typer utstyr som for eksempel vekter, pipetter, kjøleskap, fryserer, inkubatorer, pH-metere, autoklaver, sikkerhetskabinetter og komplette analysemaskiner. Kalibreringsintervallet vil i hvert tilfelle

være avhengig av ulike forhold som for eksempel presisjon, tillatte grenser for avvik, stabilitet, hensikt og praksis vedrørende bruk, erfaring med liknende utstyr og produsentens anbefalinger. Det er viktig at laboratoriet har nedfelt hvem som har ansvaret for hvert enkelt instrument, og at man har rutiner for hvordan man skal håndtere avvik som påvises gjennom kontrollprogrammet.

2.4 Nye serologiske testsystemer skal valideres

Før innføring av et nytt serologisk testsystem må analysen gjennomgå en validering slik at man bekrefter på en objektiv måte at testen fungerer etter hensikten. Det medisinske behov for analysen bør være klarlagt. Analysens ytelse må være kjent fra produsentuavhengige undersøkelser. Dette omfatter blant annet sensitivitet, spesifisitet, repeterbarhet, reproducerbarhet, robusthet og linearitet. Henvisning til produsentens bedriftsinterne materialer er ikke tilfredsstillende. Man må også definere tilfredsstillende kvalitetskontroller for testen. Endelig må man avklare hvordan resultatene fra analysen skal tolkes og formidles til rekvirenten.

Kravene til kvalitetskontroll ved innføring av nytt testsystem kan være vanskelige å oppfylle for det enkelte laboratorium. Etter vedtak i Styremøtet for medisinsk mikrobiologiske laboratorier administrerer Referansegruppen for virologi – serologi et nasjonalt nettverk for testevaluering som kan bidra til validering av tester. Strategimøtet anbefaler at fagmiljøet i sterkere grad tar i bruk dette nettverket.

2.5 Ethvert testsystem må ha relevante kit-avhengige kontroller.

Kit- eller testavhengige kontroller benyttes for å bekrefte at analyseoppsettet er gyldig, det vil si sikre at reagensene er virksomme og at testsystemet er riktig kalibrert. Valg av reagenskontroller er avhengig av de enkelte komponenter som inngår i analysen (substrat, konjugat, antigen, komplement, hemolysin etc). Kalibreringen kan enten innebære en bestemmelse av en analytisk eller en diagnostisk cut-off og gi grunnlag for kvantitativ mengdeangivelse. Kalibratorene kan være ett-punkts eller flerpunkts.

Man er henvist til å stole på produsentenes valg av kontroller og angivelser av tilhørende verdier og tolkninger. Imidlertid må man kreve dokumentasjon fra leverandør på at testen viser det den skal. Prinsipielt må testoppsett hvor kitkontrollene ikke ”går inn” repeteres. Det er akseptabelt å vurdere hva et eventuelt avvik kan innebære for selve resultatet og tolkningen av dette, og eventuelt kun gjenta analyser hvor det knytter usikkerhet til konklusjonen. Håndteringen av en slik praksis må være beskrevet i laboratoriets kvalitetssystem. Det kan være hensiktsmessig å monitorere resultater av kitkontroller som ikke har kalibreringsfunksjon.

2.6 Ethvert testsystem må ha relevante kit-uavhengige kontroller (driftskontroller).

Driftskontroller benyttes for å overvåke stabilitet, det vil si sikre at resultatene til enhver tid er gyldige. Valgte kontroller skal etablere sporbarhet for testen. De må være stabile og best mulig reflektere relevant klinisk materiale. Antall og reaktivitetsnivå på valgte kontroller må være tilpasset testens anvendelse og klinisk tolkning av resultatene. Kontrollresultatene må loggføres løpende og analyseres på en slik måte at metodens usikkerhet og stabilitet synliggjøres. Kontrollenes verdier danner grunnlag for etablering av definerte alarm- og aksjonsgrenser, det vil si signalisere når testen er truet eller ute av kontroll, og tiltak derfor må iverksettes.

Enkelte kit-uavhengige kontroller er standardiserte og kan kjøpes kommersielt. Standardiseringen er ofte utført i kun ett eller få testsystemer og derfor ikke nødvendigvis egnet i et annet testsystem for samme parameter.

Kit-uavhengige kontroller kan produseres i eget laboratorium. Det må etableres sporbarhet for disse gjennom sammenlignende måling mot standardmateriale, analyse ved referanselaboratorium eller gjennom sammenlignende laboratorieprøving.

Forslag til alarmgrense: Verdi av en enkeltkontroll utenfor ± 2 SD av gjennomsnitt.

Forslag til aksjonsgrense: Verdi av en enkeltkontroll utenfor ± 3 SD av gjennomsnitt eller ved gjentatt måling utenfor ± 2 SD av gjennomsnitt.

2.7 Alle analyser bør omfattes av et eksternt kvalitetskontrollprogram.

Ekstern kvalitetskontroll omfatter all uavhengig kontroll som bidrar til å sikre laboratoriets analysekvalitet. Dette kan omfatte ulike elementer som i) gjennomgang ved offentlig tilsyn, ii) vurdering gjennom selvvalgt bedømming for akkreditering eller iii) spesifikt analyserettet deltakelse i eksterne kvalitetskontrollprogrammer (ringtester). Offentlig tilsynsordning slik den praktiseres i dag, er utilstrekkelig som kvalitetssikring i laboratoriet.

Ringtestene er en sammenlignende laboratorieprøving (SLP). Slike arrangeres av eksterne uavhengige organer hvor man kan kjøpe deltakelse innen spesifiserte områder eller analyser. Folkehelseinstituttet arrangerer nasjonal ringtest. Denne omfatter ofte også spørsmål omkring analysestrategi og tolkning. Virologisk-serologisk ringtest bør bestå. Akkreditering av denne virksomheten vil være en fordel. Ekstern kvalitetskontroll kan også arrangeres ved at laboratorier selv arrangerer SLP ved utveksling av materiale for analyse. Det ble på møtet fremhevet at sterkt positive ringtestprøver kan ha begrenset verdi.

2.8 Analyseresultatene må vurderes i relasjon til testsystemet

2.8.1 Titreringer

Fortynningsrekke: Mest anvendt er to-fold fortynninger. Spørsmål ble brakt opp om alle laboratoriene vil anvende rekken 2-4-8, bl.a. for å lette sammenligning av resultatene ved ringtestundersøkelsene.

Titerstigning: Avlesning av én verdi for hvert titertrinn (diskontinuerlig avlesning, eks. KBR) krever minst 4x titerstigning for signifikant antistofføkning. Hvis det er viktig, kan en repeterte analysen og skyte inn tettere trinn ved omslagspunktet slik at rekken blir aritmetisk (eks. 16-32-48-64). Kravet blir da minst 2x titerstigning.

Middelverdi: Geometrisk middel ved diskontinuerlig avlesning, ellers aritmetisk.

2.8.2 Enzymmerking

Avlesning: Absorpsjon avleses ved fast tid (OD-verdi) eller ved tid for å oppnå en bestemt absorpsjon ("rate"). OD ligger vanligvis mellom 0,2 og 2,0, mens "rate" dekker et bredere område.

Signifikant antistofføkning og avlesning av delta-OD: Lineær proporsjonalitet mellom antistoffmengde og OD-verdi sees bare for OD-verdier like over cut-off verdien. For vurdering av antistofføkning, dvs. 2x OD, bør hvert serum fortynnes til OD like over cut-off. Likeledes må det vises forsiktighet ved vurdering av delta-OD når OD for kontrollantigenet er over 0,5. Avlesning av "rate" (eks. Axsym) muliggjør bruk av hele det registrerte området, idet det her foreligger lineær proporsjonalitet.

Fabrikantene informerer ikke om begrensningene for lineær proporsjonalitet mellom OD og antistoffmengde og nevner ikke problemene ved delta-OD avlesning.

2.9 Trouble-shooting

Trouble-shooting er en krevende prosess som fordrer god innsikt i prosedyrer, instrumentfunksjon og pasientforhold. Når analyseresultatet samsvarer dårlig med de kliniske opplysningene, må undersøkelsen repetéres. Dersom resultatet blir det samme, kan det bli nødvendig å gå gjennom alle ledd i undersøkelsen.

Feilkilden kan ligge i forhold forut for testingen som forbygging av prøver, noe som eventuelt kan avsløres ved blodtyping. I noen tilfeller kan særlige forhold ved pasientens sykdom påvirke immunsvaret (eks. autoimmun sykdom, immunsuppresjon).

Analysefeil varierer med anvendt metode. Feilsøking krever detaljert kjennskap til prosedyrene for hver undersøkelse og innsikt i metodens sensitivitet og spesifisitet med de antigener som anvendes (for KBR se "Komplementbindingsreaksjonen for påvisning av serumantistoff", utgitt i 1996 etter en strategikonferanse). Det kan være nødvendig å supplere med tester basert på et annet prinsipp (eks. alternativ ELISA, Western blot) eller å utføre PCR. Ved bruk av automatisert utstyr får en begrenset innsikt i de enkelte prosesser, og det er da særlig viktig å anvende supplerende tester for å avdekke mistenkte feil. Spesifikke IgM tester krever særlig kritisk vurdering pga. relativt hyppig falsk positivt resultat, særlig ved bruk av indirekte ELISA tester. En bør derfor ikke basere diagnostikk på IgM test alene. Mulighet for "prosone" må også taes i betraktning.

2.10 Om tolking og rapportering

En svarrapport skal være klar og entydig og inneholde alle opplysninger som tolkningen baseres på. Forkortelser bør unngås hvis de ikke er alminnelig kjent. Det må klart fremgå hvilken metode som er brukt, ev. også firma for testkit. En rekke eksempler på ulik rapportering av prøveresultat og ulik kommentering ble presentert og illustrert ved hjelp av utsendte kasuistikker. Det var ikke hensikten og heller ikke mulig å diskutere alle sider av dette i plenum, men den betydelige divergensen i svarrutinene viste behovet for nøyere gjennomgang av prosedyrene for både analyseresultater og kommentarer.

Møtet anbefalte derfor at referansegruppen oppnevner en arbeidsgruppe som skal utarbeide anbefalinger for svarrutiner for både rapportering av analyseresultater og for standardkommentarer. Det endelige resultat vil bli gitt ut som egen rapport.

FORELESNINGSSAMMENDRAG

3 Hvilken plass har antistoffpåvisning i mikrobiologisk diagnostikk i dag?

Eivind Ragnhildstveit, Mikrobiologisk avdeling, Sykehuset Østfold HF, Fredrikstad

3.1 Noen fordeler ved serologisk diagnostikk

- Serumprøve er en enkel og lettvinnt prøve å ta, enkelt for rekvirent og pasient (obs barn)
- Serum er et veldefinert homogent materiale, ”vanligvis” sterilt (obs blodbårne vira)
- Serum kan lagres, retestes, sammenlignes med nye prøver. Kan følge sykdomsutvikling
- Serumbank
- Metodene er blitt enklere. Lar seg automatisere. Store serier. Relativt rimelige (EIA)
- Hurtigtester / hurtigdiagnostikktester (agglutinasjonstester, dot-blot)
- Kommersielt lett tilgjengelige
- Stadig bredere spektrum, nye antistofftester mot nye agens
- Egnet for elektronisk rapportering, kobling mellom analysemaskin og laboratoriets EDB system (logistikk)

3.2 Noen ulemper ved serologisk diagnostikk

- Antistoffpåvisning er indirekte diagnostikk, man påviser ikke selve agens
- Antistoffene kan komme sent i sykdomsforløpet, forsinket i forhold til agenspåvisning
- Varierende forhold omkring sensitivitet og spesifisitet, og forekomst av falske positive reaksjoner, falske negative reaksjoner, kryssreaksjoner og inhibitorer
- Forekomst av uspesifikke IgM reaksjoner
- Begrensninger ved hemolytiske sera, kontaminerte sera, lipemiske sera, og for lite serummateriale

3.3 Trender

- Antistofftestene er blitt flere, raskere, enklere, mer automatisert, billigere (?) og bedre (?).
- Kombinerte antigen-antistofftester
- KBR , P&B , AST, ”hjemmelagde” tester på vei ut .
- Kommersielle tester på vei inn
- ”Nær pasienten tester” og hurtigere tester på vei inn. Sammenheng bl.a. med økt mulighet for spesifikk antiviral behandling

Ser man på antistoffpåvisning kontra molekylærbiologiske metoder (PCR baserte tester), vil der trolig bli god plass til begge deler. Det finnes gode og raske metoder for serologisk diagnostikk av for eksempel hepatitt A, B og C, rubella, parvovirus B19 og HIV. Kan automatiseres til store serier. Innen diagnostikk av eksempelvis enterovirus, herpesvirus og respirasjonsvirus vil PCR-baserte metoder trolig vinne sterkt fram. En rekke hurtige antigen- og antistofftester, for eksempel basert på immunkromatografisk teknikk (putetester), vil også vinne fram. Pasientnære tester blir stadig mer etterspurt.

Antistofftesting vil også i overskuelig framtid være en viktig hjørnestein i vår mikrobiologiske diagnostikk.

En annen diskusjon, som er noe perifer i denne sammenheng, er dette med differensiering, arbeidsfordeling, spesialfunksjoner, referansefunksjoner. På ett sted kan antistofftesting være eneste diagnostiske mulighet, mens andre steder kan man supplere med annen diagnostikk. En vanskelig diskusjon er også når vi skal legge ned gamle tester når nye kommer til.

Tabellen antyder fordeling av agens der

1. serologi vanligvis er den viktigste diagnostiske tilnærming.
2. serologi og agenspåvisning vanligvis kombineres i diagnostikken.
3. serologi er et supplement til annen hoveddiagnostikk.

1) Viktigste mulighet	2) Serologi og agenspåvisning kombineres	3) Supplement til annen hoveddiagnostikk
Chlamydia pneumoniae Chlamydia psittaci Hepatitt A virus Hepatitt E virus HTLV I/II Humant parvovirus B19 Mycoplasma pneumoniae Rubella Toxoplasma gondii Treponema pallidum Immunstatus undersøkelser Screening undersøkelser	Bordetella pertussis Borrelia burgdorferi EB-virus Ehrlichia Flavivirus/TBE Francisella tularensis Hanta (Puumala) virus Hepatitt B virus Hepatitt C virus Hepatitt D virus HIV 1 + 2 Meslingeвирус Parotittvirus Varicella-zoster virus	Adenovirus Aspergillus Blastomyces Brucella Chlamydia trachomatis Corynebakterium diphtheriae Cytomegalovirus Enterovirus Gonokokker Helicobacter pylori Herpes simplex virus Histoplasma Influenzavirus Parainfluenzavirus Leptospira Legionella Leishmania Listeria Meningokokker Mycobakterier Parasitter RS-virus Streptokokker Stafylokokker Salmonella Yersinia

4 Oversikt og utvalg

Pål A Jenum, Divisjon for smittevern, Nasjonalt folkehelseinstitutt

4.1 Kvalitetskontroll – hva omfattes?

Kvalitetskontroll av serologiske analyser er én brikke i et stort kvalitetsnettverk som omfatter hele laboratoriet. Selve analysene kan ikke sees isolert fra resten av helheten.

1. Organisasjon og ledelse
2. Kompetanse og utdanning
3. Prøvemottak, registrering og rapporteringsrutiner
4. Konfidensialitet
5. Utstyr og forbruksvarer
6. Analysene
7. Avviks- og klagebehandling
8. Regelmessig gjennomgang

4.2 Grensesnitt mot akkreditering

Det er prinsipielt opp til det enkelte laboratorium å definere hva de vil anse som god eller tilstrekkelig kvalitet på virksomheten. En uavhengig vurdering av laboratoriets kvalitetssystem kan man få dersom man søker om bedømming for akkreditering, og et akkreditert laboratorium vil ha et godkjenningsstempel for kvalitet. Akkrediteringsorganene benytter krav og retningslinjer formulert i internasjonale standarder som grunnlag for kvalitetsbedømmingen. Også ulike veiledningsdokumenter godkjent av det enkelte akkrediteringsorganet benyttes.

4.3 ISO 17025

De ”ideelle” krav er i prinsippet nedtegnet i en internasjonal standard NS-EN ISO/IEC 17025. Dette er en generell standard for alle typer medisinske laboratorier, og det er denne standarden medisinsk mikrobiologiske laboratorier normalt vil bli bedømt i forhold til dersom de søker akkreditering.

4.4 Sektorkomité P8

Siden medisinsk mikrobiologi har en del særegne problemstillinger, er det viktig å vite hvilke krav som vil bli stilt til oss i akkrediteringssammenheng. Norsk akkreditering har opprettet en såkalt ”sektorkomité P8” som skal belyse disse spørsmålene og lette arbeidet både for søkerlaboratoriene og for bedømmerne. Det er ikke meningen at komitéen skal innføre tilleggskrav til ISO 17025 men utdype hva som ligger i kravene. Rapporten ble ferdig februar 2002 (<http://www.justervesenet.no/na> [”Siste nytt”])

4.5 Temaer

Valg av temaer til dette strategimøtet er knyttet direkte til analysene: etablering, gjennomføring, kontroll og vurdering. Disse emnene er i hovedsak de samme som P8 skal vurdere selv om P8 ikke bare skal vurdere serologi men hele feltet innen medisinsk mikrobiologi.

Tema sektorkomité P8	Tema strategimøtet 2001
Validering av metoder	Etablering av nytt testsystem
	Kontrollrutiner for teknisk apparatur
Ekstern kvalitetskontroll	Ekstern kvalitetskontroll
Sporbarhet og referansematerialer	Kit-avhengige kontroller Kit-uavhengige kontroller Ekstern kvalitetskontroll
Faglig vurdering	Medisinsk vurdering
	Kritisk blikk på analysetallverdiene
	Problemområder

4.6 Målsetning

Vi ønsker å klarlegge elementene som inngår i den serologiske analysekontrollen, gi råd og vink til praktisk organisering av gode kontrollrutiner, og belyse problemer knyttet til vurdering og rapportering av serologiske analyser.

Konklusjoner, momenter og synspunkter som kommer frem, vil bringes tilbake til P8 sektorkomitéens arbeid. På den måten vil miljøets synspunkter kunne påvirke formuleringen av de kravtilpasninger laboratoriene selv vil bli møtt med dersom de ønsker å søke om akkreditering senere.

5 Hva kreves av produsenter av kommersielle testsett?

Ivar Ørstavik, Divisjon for smittevern, Nasjonalt folkehelseinstitutt

5.1 Diskusjonsinnlegg

Nytt EU-direktivet om in vitro diagnostika med vedlegg om felles tekniske spesifikasjoner (CTS).

Omsetning og kontroll av medisinsk utstyr (medical device/MD) i EU reguleres av tre direktiver, hvorav det sist publiserte omhandler in vitro diagnostika (IVD). Etter EØS avtalen følges direktivene opp av norsk lovgivning (Lov om medisinsk utstyr av 12. januar 1995.). IVD-direktivets bestemmelser ble implementert ved en endring i Statsråd 26. oktober 2001 av Forskrift av 12. januar 1995 om medisinsk utstyr.

IVD MD Direktiv 98/79/EC 27.10.1998, publisert 07.12.1998, skal harmonisere reguleringen og lovgivningen på området for å sikre fri omsetning. Direktivet angir hvilke essensielle krav som stilles til produktene som betingelse for at de kan markedsføres innen EØS-området og angir forskjellige prosedyrer for å oppnå samsvar med kravene som stilles. Produkter som oppfyller kravene i direktivet vil kunne få et CE-merke. I en overgangsperiode t.o.m. 07.12.2003 vil IVD med og uten CE-merke kunne markedsføres. Videre frem t.o.m. 07.12.2005 vil IVD både med og uten CE-merke kunne brukes, men fra 08.12.2005 vil kun CE-merkede produkter kunne brukes. Direktivet gjelder ikke produkter som utelukkende produseres og brukes innenfor én og samme helseinstitusjon og på produksjonsstedet, eller som brukes i lokaler som ligger i umiddelbar nærhet uten å bli overført til en annen enhet.

Direktivet deler IVD inn i fire forskjellige kategorier etter hva de skal brukes til og hvilken risiko de representerer for folkehelse eller for pasientbehandling hvis produktet ikke fungerer etter hensikten. De produkter som det stilles strengest krav til er nevnt spesielt i et vedlegg (Annex II List A Products), og omfatter reagenser og reagensprodukter med tilhørende kalibrator og kontrollmateriale (1) til bestemmelse av nærmere angitte blodtyper, og (2) til påvisning, bekreftelse og mengde-bestemmelse i humant prøvemateriale av markører for HIV-infeksjon (HIV 1 og 2), HTLV I og II og hepatitt B, C og D. For liste A produkter er det utarbeidet felles tekniske spesifikasjoner (CTS)», som stiller krav til

- Analytisk og diagnostisk sensitivitet
- Kriterier for frigivelse av produksjons-batcher

CTS er allerede tatt i bruk for å kunne gi produkter CE-merket, selv om de først vil bli endelig godkjent og publisert høsten 2001. Nedenfor er gjengitt en tabell over krav til yteevne for serologiske tester for retrovirus- og hepatittvirus tester

Mens en hittil har hatt nasjonale godkjenningsordninger basert på lignende yteleseskriterier for de aktuelle Annex-II-IVD i enkelte større land i EU, gir direktivet anvisning på en endret godkjenningsprosedyre: Såkalte tekniske kontrollorgan eller ”meldt organ” (”notified bodies”) er organisasjoner sertifisert for å godkjenne produkter på basis av produsentens egendokumentasjon av oppfyllelse av direktivets krav, og som også kan utføre undersøkelser av enkelte produkter. Her opptrer både tidligere kjente, nasjonale godkjenningslaboratorier som for eksempel Paul Ehrlich Institut i Tyskland i konkurranse med andre laboratorieorganisasjoner. Krav til fri handel har på en måte ført til en mer uoversiktlig situasjon enn tidligere, og det gjenstår å se om de nye kontrollordninger vil fungere tilfredsstillende.

Det er imidlertid etablert flere kontrolltiltak i direktivet. Blant annet skal alt medisinsk utstyr, inklusive IVD, før det markedsføres med CE-merket i et land, registreres hos en myndighet (Competent Authority) som i Norge i dag er Statens helsetilsyn som forvalter av Lov om medisinsk utstyr. Alle som markedsfører IVD er også pålagt å etablere et overvåkingssystem for feil som kan føre til alvorlig helseskade eller død (Vigilance), og det skal også etableres et meldingssystem mellom statlige myndigheter i de forskjellige land for alvorlige feil (Safeguard Clause). Det skal også utarbeides en felles EU-database for registrerte produkter. I løpet av 1990-årene er det også utarbeidet en rekke europeiske standarder for produsenter av IVD, som sikkert vil bidra til å sikre at produsentene kan oppfylle kravene i direktivet.

Vi er inne i en periode med endrede krav til produsenter av IVD. Godkjenningsprosedurene kan minne om dem vi kjenner for produsenter av legemidler, og det er ingen tilfeldighet at «kompetent myndighet» i enkelte land er tillagt samme institusjon som godkjenner legemidler. De nye kravene skal sikre pasientene samtidig som produktene skal kunne omsettes fritt i hele EU-området. Også for oss som brukere av IVD vil de nye reglene og hvordan de vil virke ha betydning.

Tabell Eksempel på direktivets felles tekniske spesifikasjoner (CTS) for IVD som brukes ved blodscreening. (modifisert etter IVD Technology Vol 7, No 5, 2001)

Standard for utføring	Prøvetyper	Anti-HIV-1	Anti-HIV-2	Anti-HTLV 1	Anti – HTLV II	Anti-HCV	HBsAg	Anti-HBc
Diagnostisk sensitivitet	Positive prøver	400a	100 ^a	300	100	400 ^b	400 ^c	400 ^d
	Serokonversjonspaneler	20e	20 ^e	20	20 ^e	20 ^e	20 ^e	
Analytisk sensitivitet	Standarder						0,5ng/ml ^f	
Diagnostisk spesifisitet	Uselekterte givere	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000
	Sykehuspasienter	200	200	200	200	200	200	200
	Problemsera	100	100	100	100	100	100	100
<p>Prøver må omfatte 40 non-B subtyper; hver representert med minst tre prøver. Prøver må inkludere genotyper 1a-4a, representert fra et minimum av 20 prøver pr. genotype. Prøver må også inkludere genotyper 4non-a og 5 representert fra et minimum av 10 prøver pr. genotype. Må omfatte forskjellige subtyper. Må omfatte evaluering av andre HBV markører. I tillegg må 10 paneler testes av teknisk kontrollorgan eller produsent. Fransk eller engelsk standard</p>								

6 Kontrollrutiner for teknisk apparatur

Anne-Lise Bruu, Divisjon for smittevern, Nasjonalt folkehelseinstitutt

6.1 Generelt

Instrumenter og utstyr i de mikrobiologiske laboratoriene som må tas med i laboratoriets kvalitetssystem kan være alt fra pipetter til analysemaskiner. For en del av utstyret er det krav om kalibrering. Kalibrering er fastlegging av verdien til en normal eller skalaen til et måleinstrument i forhold til en mer nøyaktig normal eller instrument (fra "International Vocabulary of Basic and General Terms 1993"). I mikrobiologien er det stort sett bare utstyr som kalibreres. Et eksempel er kalibrering av vekt med lodd av kjent masse. Vi må skille mellom kalibrering og kontroll. Et eksempel på en kontroll er at temperaturen i et kjølerom sjekkes ukentlig og at resultatet, samt dato og initialer på kontrollør noteres i en loggbok, men temperaturen sjekkes ikke ukentlig mot et referansetermometer. Sporbarhet kan vi definere som evnen til, ved hjelp av nedtegnet identifikasjon, å spore forløpet, anvendelsen eller lokaliseringen av en gjenstand eller aktivitet.

6.1.1 Fra ISO 17025

Det står i ISO 17025 (5.5.2): "Utstyr og dets programvare som brukes for prøving, kalibrering og prøvetaking, skal være i stand til å oppnå den nøyaktigheten som kreves, og skal stemme overens med spesifikasjoner som er relevante for den prøvingen og/eller kalibreringen det gjelder. Programmer for kalibrering skal etableres for instrumentenes nøkkelparametere eller verdier når disse egenskapene har en betydelig innvirkning på resultatene. Før utstyr blir tatt i bruk (inkludert det som brukes for prøvetaking), skal det kalibreres eller kontrolleres for å fastslå at det oppfyller de kravene laboratoriet har angitt, og stemmer overens med de relevante kravene i standard." I standarden står det videre (5.5.3): "Utstyr skal brukes av bemyndiget personell. Gyldige instruksjoner for bruken og vedlikeholdet av utstyr (inkludert relevante håndbøker som utstyrets produsenter skaffer) skal være lett tilgjengelig for bruk av det aktuelle laboratoriepersonellet". Alt utstyr skal selvfølgelig registreres, og laboratoriet skal ha et etablert program og prosedyrer for kalibreringen av sitt utstyr.

6.1.2 Fra NA dok 48, pkt. 2.5

Ansvar for at kalibrering og service utføres av en instans med nødvendig kompetanse, ligger hos laboratoriet. Laboratoriet, sykehuset eller instituttets tekniske avdeling eller en kompetent institusjon (for eksempel produsent eller leverandør) skal kalibrere eller verifisere instrumentets basale størrelse (for eksempel volum, temperatur, absorbans, bølgelengde og linearitet) og rapportere dette sammen med usikkerhetsberegninger hvis disse størrelsene har vesentlig effekt på måleresultatene. Målingene skal, så sant det er mulig, kunne spores tilbake til nasjonale og/eller internasjonale normaler.

6.2 Kalibrering

Det er krav om kalibrering av vekter, pipetter og termometre.

6.2.1 Vekt

For vekter har et kalibreringsintervall på 1-2 år blitt foreslått av Norsk Akkreditering, forutsatt at de har vært stabile over tid. Kalibreringen må utføres av en godkjent instans og dokumenteres ved et kalibreringsbevis.

6.2.2 Volum

Pipetter og glassvarer kalibreres for eksempel ved veieprosedyrer med sporbar kalibrert vekt. De kan sendes bort for kalibrering, men det er meget kostbart, og kalibreringen kan derfor gjøres internt på laboratoriet. Kalibreringen bør foretas minst to ganger i året og etter reparasjoner. Annet volumetrisk utstyr er dispensere og dilutere. Her anbefales kalibrering initialt og deretter regelmessig sjekk for å dokumentere at de tar opp ønsket volum.

6.2.3 Analysemaskiner

Det viktig å inngå en avtale med produsent eller leverandør av analysemaskiner om årlig kalibrering, slik at volum, temperatur og bølgelengde kontrolleres. I tillegg kommer den interne kalibreringen som utføres på laboratoriet hver 2.-4. uke, avhengig av hvilken maskin man har, samt etter reparasjon eller modifisering. For enkelte maskiner foregår den interne kalibreringen automatisk. Når en ny batch reagenser tas i bruk, må også intern kalibrering kjøres. For ELISA-avlesere kan man kjøpe en plate for månedlig kalibrering av absorpsjon og bølgelengde. Termocyclere kan kontrolleres av produsent eller leverandør, men det blir meget kostbart. Det finnes et kit for månedlig kontroll, slik at man kan utføre denne kontrollen selv.

6.2.4 Temperatur

Temperaturkontroll av kjøleskap, frysere og inkubatorer utføres med kalibrerte termometre der temperaturkontroller er av vesentlig betydning for måleresultatet. Kalibreringsintervall settes individuelt, avhengig av kjent stabilitet, punkter i service eller vedlikeholdsprogram som påvirker de basale størrelsene etc. Temperaturen i kjøleskap, frysere, inkubatorer og fryserom kan måles en gang i uken, og resultatet føres inn i en logg-bok som nevnt ovenfor. Ukentlig kontroll forutsetter stabilitet. Hvis ikke det er tilfelle, må kontrollen utføres hyppigere. Kalibreringen bør utføres en gang i året. I vannbad hvor stabiliteten av temperaturen og tid for å oppnå ønsket temperatur spiller en rolle, kalibreres initialt og senere ved reparasjoner og modifikasjoner, ellers regelmessig kontroll som nevnt ovenfor. Det er viktig å være klar over at laboratoriets referansenormaler bare skal brukes til kalibrering og ikke til andre formål. Kalibreringsintervall for et referansetermometer er ≤ 2 år. I tillegg kommer årlig kontroll mot en referansetemperatur, for eksempel is-punktet.

6.2.5 Sentrifuger og pH-metre

Sentrifuger kalibreres hvis de påvirker måleresultatet. pH-meter sjekkes forut for hver gangs bruk.

6.2.6 Autoklaver

Autoklaver skal ha mulighet til å oppfylle spesifisert temperaturområde. Her kreves det en gjennomgang initialt og etter reparasjoner eller modifikasjoner. Det kreves også enten utskrift av temperatur, bruk av maksimumstermometer eller direkte observasjon av temperaturen. I tillegg må kjemiske eller biologiske indikatorer for prosessen benyttes.

6.2.7 Sikkerhetskabinetter

Selv om et avvik ved et sikkerhetskabinett ikke nødvendigvis har innvirkning på analyseresultatet, har det betydning for operatøren av kabinettet at det fungerer som det skal. Årlig kontroll av sikkerhetskabinett anbefales for kontroll av bakgrunnsbelastningen i rommet, lufthastigheten gjennom arbeidsåpningen og vertikal lufthastighet i arbeidskammeret. Samtlige HEPA-filtre må også testes. Rapporter for gjennomgang av hvert enkelt kabinett arkiveres. Hvis det blir påvist avvik ved et kabinett, er det viktig å aksjonere umiddelbart.

6.3 Momenter ved ekstern bedømmelse

6.3.1 Rutiner

Ved en bedømmelse for akkreditering blir det sjekket om laboratoriet har

- kontroll- og kalibreringsprogrammer
- sporbarhet for målinger, hvordan laboratoriet etablerer det, og om dokumentasjonen er tilfredsstillende (inkludert loggbøker)
- register over instrumenter
- kalibreringsmerker
- rutiner for vedlikehold
- skikkelig merking av kjemikalier, rutiner for kontroll av reagenser og forbruksmateriell

Minst like viktig som å ha rutiner for kalibrering og kontroll av utstyr er at man også har nedfelt hva man skal gjøre hvis avvik oppstår, det vil si at et avvik umiddelbart følges av en aksjon. Det er også nødvendig å nedfelle hvem som er ansvarlig for hvert enkelt instrument, og for å sikre kontinuitet bør det være minst to personer.

6.3.2 Kalibreringsintervall

Kalibreringsintervallet vil være avhengig av

- presisjon og tillatte grenser for avvik
- stabiliteten til utstyret
- hensikt og praksis vedrørende bruk
- erfaring med lignende utstyr
- produsentens anbefalinger
- spesielle forhold vedrørende utstyret eller laboratoriet

Valgt intervall må være angitt. Det må også være gjenstand for revisjon. Personalet må få opplæring og erfaring i å foreta intern kalibrering. I laboratoriets kalibreringsprogrammer må også dato for siste og for neste kalibrering være anført. En liste over utførte kalibreringer må også kunne skrives ut.

7 Noen aktuelle problemstillinger ved etablering av nytt testsystem i serologi

Kjetil K. Melby, Mikrobiologisk avdeling, Ullevål Universitetssykehus

7.1 Innledning

Når medisinsk mikrobiologiske laboratorier introduserer nye undersøkelsesmetoder for påvisning av enten mikrobielle antigener eller mikrobepesifikke antistoffer, bør en del forutsetninger være oppfylt. Disse baserer seg på medisinsk viten og/eller offisielle ”føringer”. Sistnevnte vil i den laboratorimedisinske hverdag manifestere seg i form av

- Offisielle formelle tekniske rammebetingelser
- ISO 17025. Generelle krav til prøvings- og kalibreringslaboratoriets kompetanse

Denne standarden angir bl.a. retningslinjer for prøving, kalibrering og validering av metoder

- om valg av metoder
- om metoder utviklet i laboratoriet
- om ikke standardiserte metoder
- om validering av metoder

7.2 Faglig dokumentasjon

Internt i laboratoriet forutsettes man å ha klarlagt dokumentasjon knyttet til

- Analysens mål/hensikt
- Analysens sensitivitet
 - Egne studier
 - Dokumentasjon fra leverandør
- Analysens spesifisitet
 - Egne studier
 - Dokumentasjon fra leverandør

7.3 Praktiske forhold

Forhold som også må avklares før oppstart

- Teknisk format
- Analysens hensikt
- Relevans for klinikken
- Undersøkelsens (analysens) behov (marked)
- Antall analyser pr år
- Analysens pris
- Kostnadene pr analyse alle kostnader medregnet. Kostnad-nytte vurderinger
- Organisering av besvarelsesrutiner

7.4 Forslag til valideringskrav

Før en aktuelle metode kan anvendes rutinemessig foreslås følgende opplegg

Tema	Hvis bare egen underøkelse	Hvis norsk dokumentasjon	Kommentar
Antall kjente positive prøver	ca 20 – 50	5-10 (?)	
Parallellkjøring i egen rutine	ca 100	20 – 50	
Evaluering	Faglig minst like god? Løst de aktuelle tekniske problemer? Løst de aktuelle økonomiske problemer? Besvarelsesrutiner OK?		Hvis OK START rutine
Ny evaluering	Re-evaluering etter for eksempel 6 –12 måneder		

7.5 Sammenfatning

Før en undersøkelse (analyse) tas inn i rutinen skal

- det helsemessige (medisinske) behov være godt kartlagt.
- dens sensitivitet og spesifisitet være kjent enten fra egne undersøkelser eller fra andre, fortrinnsvis produsent uavhengige undersøkelser.
- besvarelsesrutiner være adekvat etablert.
- kostnader være avklart

8 Kit-avhengige kontroller

Terje Aspenes, Sissel Andreassen, Tore Jarl Gutteberg, Mikrobiologisk avdeling, Universitetssykehuset Nord-Norge

8.1 Inndeling og funksjon

Kontroller	Funksjon
Kit-avhengige	
Reagenskontroller	Tester at enkeltreagensene fungerer: Substrat, konjugat, komplement, antigen, hemolysin, etc.
Kalibratører Ett punkts kalibrator Flerpunkts kalibrator	a) Bestemmelse av cut-off definerer hva som er positivt og negativt og gir analyseverdier c) Etablerer standardkurve for mengdeangivelse
Kit-uavhengige	a) Kontroller som blir brukt for å kontrollere kit, egenproduserte eller kommersielle b) Løpende kontroll, driftskontroll, dag-til-dag variasjon
Sammenlignings kontroller	Sammenligner resultater fra egne oppsett med andres resultater Sammenlignende laboratorieprøving (SLP) hører inn under her (Ekstern kvalitetskontroll)

Kit-avhengige kalibratører skal ideelt sett kunne gi en standardkurve og definere brytningspunktet mellom reaktivt (positivt) og negativt resultat. Flerpunkts kalibrator skal gi standardkurve. Dokumentasjon (publisert) for disse egenskapene er av største betydning for å vurdere om vi skal stole på testene.

I vår presentasjon vil jeg diskutere to eksempler på hvordan dette er løst med vekt på følgende:

- Kan jeg stole på produsentens valg av og angitt måleresultatområde for kontroller?
- Hva gjør jeg med prøveresultatene hvis kontrollene ikke ”går inn” ? Kan det settes opp retningslinjer for hvordan man bør tenke og hva man bør gjøre?
- Har det noen hensikt å løpende monitorere resultatene av kit-kontroller? Hvilken hensikt skulle det i så fall ha?

9 Ekstern kvalitetskontroll

Gunnar Hoddevik, Divisjon for smittevern, Nasjonalt folkehelseinstitutt

9.1 Generelt

Det er generelt en økende fokusering på kvaliteten på de tjenester og ytelser en betaler for, hva enten det gjelder varer i butikker eller offentlige tjenester. Dette skyldes et frihandelsmarked med konkurranse, økt internasjonal handel og økt krav om produktinformasjon.

I Norge er alle som yter helsetjenester pålagt i lov å ha et internkontrollsystem (§ 3 i Lov om statlig tilsyn). Dette systemet skal sikre at man planlegger, utfører og vedlikeholder tjenestene i overensstemmelse med gjeldende lover og forskrifter og med god faglig praksis. Det er et lederansvar at internkontrollsystemet er etablert og fungerer. Dette er grunnlaget for eventuell

ekstern kontroll/tilsyn fra myndighetene ved Statens helsetilsyn og fylkeslegene. Slik kvalitetskontroll av tjenesten kan skje ved at kompetent fagpersonell om nødvendig leies inn og vurderer om tjenesten fyller kravene til god faglig praksis.

Analyse av blodprøver i forbindelse med infeksjonssykdommer er en sammensatt prosess, fra behandlende leges beslutning om å ta en prøve, prøvetakingen, forsendelsen, mottak og lagring av prøven på laboratoriet, analysearbeidet, tolkning av resultatene, klinisk rådgivning, rapport tilbake til behandlende lege og bruken av resultatene i behandlingen.

Alle medisinsk-mikrobiologiske laboratorier skal ha et internkontrollsystem som dekker prosessene fra prøvemottak til svaret sendes rekvirenten. I dette arbeidet er ulike fagpersoner involvert, men det endelige ansvaret for kvaliteten ligger hos laboratoriets medisinsk-faglige leder. I tillegg til å gjennomføre offentlige, lovpålagte krav er det opp til den fagansvarlige for det enkelte laboratorium (overlegen) å vurdere om det er formålstjenlig å benytte seg av andre eksterne tilbud for å sikre kvaliteten. De tilbud om frivillig ekstern kvalitetskontroll som er formalisert og tilgjengelige i Norge i dag, er deltagelse i ”ringtester” og ”akkreditering”.

9.2 Akkreditering

I 1996 uttalte Statens helsetilsyn at akkreditering ikke kreves av dem som yter helsetjenester i Norge. Dette er uendret i 2001. Statens helsetilsyn hindrer likevel ingen som på eget initiativ ønsker å bli akkreditert eller sertifisert i henhold til internasjonale normer. ”Akkrediteringsnormer” utarbeides av internasjonale samarbeidsorganisasjoner som er delvis offentlig styrt og finansiert. Deltagende nasjoner har stort sett et nasjonalt organ som f.eks. NA (Norsk Akkreditering) og SVEDAK (Svensk akkreditering). Nasjonale akkrediteringsorganer i Europa er i regelen underlagt politisk kontroll. De er med i ”European Cooperation for Accreditation”. Norge er representert med NA som er en avdeling i Justervesenet. Justervesenet er en organisasjon i Handelsdepartementet. NA dekker en del av sine utgiftene ved inntekter fra sine kunder.

Akkrediteringsorganisasjonen vurderer om laboratoriet utøver sin virksomhet i samsvar med en definert standard. I så fall får laboratoriet da fullmakt til å benytte NA's logo på sine dokumenter som identifiserer tjenesten, og et laboratoriesvar på en godkjent analyse kan utgis som ”akkreditert”.

Noen få medisinsk mikrobiologiske laboratorier i Norge er nå akkreditert for visse analyser. I prinsippet kan en velge fritt mellom tilgjengelige akkreditører, men i praksis har alle i Norge til nå benyttet NA. England, som et av de første land i Europa som innførte akkrediteringen av medisinske laboratorier, valgte et annet styringsmønster av akkreditering enn det vi har i Norge. Organisasjonen for akkreditering er faglig styrt ved en gruppe fagfolk hvor alle laboratoriespesialitetene er representert.

Akkreditering fritar ikke et laboratorium fra plikten til å ha et internkontrollsystem som loven krever.

9.2.1 Spørsmål

- Hva er akkreditering og hvor fører det oss hen?
- Er den eksterne kvalitetssikringen gjennom Internkontrollsystemet med krav om ”det som til enhver tid er god faglig praksis” tilstrekkelig for de medisinsk mikrobiologiske laboratoriene i Norge, eller bør de også la seg akkreditere? I hvilken grad supplerer de to systemene hverandre?

- Både Internkontrollsystemet og akkreditering er kontrollmidler for å sikre kvalitet. Finnes det dokumentasjon for at systemene virker? Kan en ut fra dette gi råd om hva som er den optimale bruken av dem?
- Kan ressursbruk ved akkreditering innenfor faste økonomiske rammer uten tilførsler av ekstra midler føre til kvalitetsreduksjon pga. omprioriteringer?

9.3 Ringtester

9.3.1 Hensikt

Målet med ringtester er at laboratorier kan måle sin tekniske og vurderingsmessige prestasjon ved å sammenligne seg med andre som analyserer samme problemstilling med samme materiale med samme test.

9.3.2 Generelt

I engelskspråklig litteratur kan en finne flere betegnelser for ringtester, for eksempel: Proficiency testing scheme, External quality assessment program, External quality assurance program og Proficiency testing by interlaboratory comparison. På Nasjonalt folkehelseinstitutt har en valgt å tilpasse den siste versjonen til norsk språkdrakt. Følgelig kalles Folkehelseinstituttets ringtester for ”sammenlignende laboratorieprøving” fordi det primært er en sammenligning av analyseresultater for deltagere som bruker samme test.

Ringtester fokuserer stort sett på det praktiske analysearbeidet. Gjennomføringen av ringtester blir kostbart om en fullstendig skal simulere innsending (fingerte prøver) fra laboratoriets etablerte rekvirenter. I de siste 10 årene har det vært et voksende marked for salg av ringtest-tjenester. Flere internasjonale offentlige, halvoffentlige og private firmaer tilbyr i dag slike tjenester. Et fellestrekk ved disse ringtestene er at det koster å delta, at de fokuserer på selve analysen. Økt bruk av ekstern kvalitetskontroll av laboratorietjenester i Norge kan for eksempel komme ved at EU vedtar direktiver som Norge må følge pga. EØS-avtalen, eller at deler av helsetjenesten privatiseres og laboratorier som f. eks. er akkreditert får et konkurransefortrinn i markedet. En del laboratorier i Norge benytter seg av tilbudene fra utenlandske ringtestarrangører. For mange analyser finnes det i dag et ringtesttilbud, men ikke for alle.

Ideelt sett bør alt prøvemateriale være ekte, ubehandlede pasientprøver. Dette kan sjelden oppfylles og en må ty til modifikasjoner som for eksempel fortykning av høytitret positivt serum, anrikning av virus ved å dyrke pasientprøver i flere cellekulturpassasjer med påfølgende fortykning i kunstige medier og frysetørking. Ringtester som kun tilbyr materialer som er sterkt positive og klart negative, er etter manges mening verdiløse. Forbytting med svake positive eller negative prøver vil være det eneste som eventuelt kan påvises, noe som ringtester trolig er lite egnet til. Kvaliteten og nytteeffekten av enkelte ringtestoppgaver er derfor omdiskutert.

Tester på agens påviser ofte de samme, stabile komponenter. Testens analytiske følsomhet avspeiler da den diagnostiske følsomhet. Gjennom deltagelse i ringtest kan tester med lav følsomhet avsløres. Dette er ofte "in house" tester som ikke har vært grundig sammenlignet med alternative kommersielle tester.

Det finnes lite forskning eller dokumentasjon på om deltagelse i ringtest generelt fører til bedre kvalitet på analysearbeidet ved laboratoriene.

9.3.3 Nasjonal ringtest

Siden 1982 har alle de medisinsk-mikrobiologiske og blodbanklaboratoriene i Norge to ganger årlig blitt invitert til å delta i det som nå kalles "Virologisk-serologisk ringtest", arrangert av Nasjonalt folkehelseinstitutt. Deltagelse innebærer å analysere et antall prøvematerialer. Ofte tas det i tillegg opp kliniske problemstillinger, hvor spørsmål om deltagerens analysestrategi og tolkning av analysesvar blir en del av oppgaven.

9.3.4 Spørsmål

- I økende grad vil de medisinsk-mikrobiologiske diagnostiske tester og tilhørende kontrollreagenser og kalibratorer som blir tilbudt i Europa, ha vært gjennom en omfattende kvalitetskontroll. Et eksempel er kravene til HIV- og hepatitt-tester i EU's "In Vitro Diagnostica Medical Device" direktiv. Her fastsettes i detalj kravene til diagnostisk og analytisk følsomhet og spesifisitet, med tilhørende kontrollreagenser inkludert. IVD-direktivet vil gjelde fra årskiftet 2003-04. Hvilken plass har ringtester da?
- Kan uformell, kollegial utveksling av materialer mellom laboratorier erstatte ringtester? Hvilke krav skal stilles? Miniringtest av minst tre deltagere som bruker samme test?
- Hvilken nytte har de medisinsk-mikrobiologiske laboratoriene hatt av den nasjonale "Virologisk-serologisk ringtest" til nå? Er det hensiktsmessig å fortsette de nærmeste åra? Bør ringtesten eventuelt endres i form og innhold?

9.4 Tanker om utviklingen de neste 5 år

- Antall internasjonale ringtesttilbud vil trolig øke.
- Internasjonalt samarbeid om og harmonisering av ringtester vil komme.
- Utvikling av antigenester og nukleinsyrebaserte tester vil ytterligere flytte det diagnostiske fokus fra serologi til agenspåvisning.
- Markedet for kommersielle tester vil fortsette å vokse.
- Erfaring viser at når tester kan produseres og selges med fortjeneste i et konkurransemarked, vil de utkonkurrere "in house" tester. Dette vil fortsette.
- Krav for akkreditering av ringtestarrangører er spesifisert i ISO Guide 43-1. ISO har under utarbeidelse en standard om hvordan ringtestresultater som kan tyde på dårlig kvalitet på selve testen, skal håndteres (prEN 14136). Kravene til ringtestarrangører vil derfor øke.
- Akkreditering krever i prinsippet deltagelse i ringtester for alle analyser, men dette kravet vurderes ut fra hva som er tilgjengelig og formålstjenlig.

9.5 "Nettverk" for forbedring og kontroll av kvalitet i Norge

"Referansegruppe for ekstern kvalitetssikring i virologi og serologi" arrangerer et strategimøte hvert år. Gjennom den nasjonale ringtesten kan det påvises forhold som det er naturlig å ta opp som tema på strategimøtene. Ringtesten kan også brukes til å vurdere om vedtak på strategimøtene følges opp av deltagerne. Referansegruppen gir råd om valg av tema for ringtestene og melder sin vurdering av ringtestrapportene tilbake til Nasjonalt folkehelseinstitutt. Målet er gjennom en løpende prosess å sikre og øke kompetansen og derved kvaliteten på laboratoriearbeidet i medisinsk mikrobiologi.

10 Bruk av kit-uavhengige kontroller i serologiske analyser

Kjell Skaug, Divisjon for smittevern, Nasjonalt folkehelseinstitutt

I kravene (ISO/IEC 17025) for sikring av kvaliteten på analyseresultatene skal laboratoriene ha prosedyrer for å overvåke gyldigheten av måleresultatene. Den kan dels bestå i bruk av kit-uavhengige kontroller i den daglige rutine (intern kvalitetskontroll), dels i å delta i sammenlignende laboratorieprøvinger. Analyseresultatene av de kit-uavhengige kontrollene benyttes over tid til å monitorere og dokumentere stabilitet i målingene samt å kontrollere endringer fra dag-til-dag og mellom batch- og lotnummer. Systemet for intern kvalitetskontroll utformes av laboratoriet med henblikk på valg av kontrollmateriale, fastsettelse av tillagte verdi, kontrollregler etc.

10.1 Valg av kontroller

For å sikre at testene oppfyller kravene til sensitivitet og reproduserbarhet, bør kontrollprøvene ha et innhold og en stabilitet mest mulig lik prøven som skal analyseres. Måleområdet for kontrollene bør være nedfelt i metodebeskrivelsene. Kontrollene kan være internasjonale standarder, referansematerialer (IU/l, etc.) og/eller sekundære referansematerialer (laboratoriets egenproduserte kontroller) som kan være laget av enkeltprøver eller av en pool av forskjellige prøvematerialer. Hvis mulig, bør slike kit-uavhengige kontroller kalibreres mot kjente standarder. Dersom det ikke foreligger kjente referansematerialer, bør en sikre at kontrollene inneholder den aktuelle mengde antistoffer og/eller antigener gjennom sammenlignende laboratorieprøvinger.

10.2 Antall kontrollprøver

Antall kontrollprøver bør vurderes ut fra aktuelle problemstilling for testingen, testens robusthet og hvor ofte testen utføres. Antallet av kontroller må også vurderes i forhold til antall prøver som skal analyseres, slik at hele oppsettet er kvalitetsovervåket.

10.3 Reaktiviteten av kontrollene

Testens repeterbarhet og reproduserbarhet er viktig for beregning av testens grenseverdi. Konsentrasjoner i nærheten av beslutningsgrenser er i denne sammenheng spesielt viktige. Når det er spørsmål om et kvalitativt positivt/negativt testresultat, kan det være aktuelt med en svak reaktiv kontrollprøve, ca. 2x cutoff verdien.

10.4 Metoder for løpende monitorering

Analyseresultatene skal registreres på en slik måte at trender kommer til syne, og når det er praktisk, skal statistiske teknikker anvendes for å gjennomgå resultatene.

10.5 Alarmgrenser og aksjonsgrenser

Ved kontrollen av analyseresultater inngår en vurdering om testresultatene av kontrollene avviker i forhold til et forventet resultat. Ved en stabil analysemetode antar man at resultatene fra gjentatte målinger av den kit-uavhengige kontrollen er normalfordelt. I vårt program for kvalitetskontroll av testene godkjennes et testoppsett dersom analyseresultatene for de kit-avhengige og kit-uavhengige kontrollene er innenfor de anførte grenseverdier (normalverdier). Selv om resultatene for de kit-avhengige kontrollene godkjennes, kan testresultatene for de kit-uavhengige kontrollene avvike. I slike tilfeller har vi som rutine at

dersom resultatene for de kit-uavhengige kontrollene avviker mer enn gjennomsnittsverdien $\pm 2SD$, repeteres testen (alarmgrense) (ved Divisjon for smittevern, Nasjonalt folkehelseinstitutt blir et referanseserum vanligvis undersøkt 20 ganger parallelt for å bestemme SD). Dersom analyseresultatene også avviker etter repetert testing, spores aktuelle feilkilder (dvs ved overskridelse av aksjonsgrensene).

Analyseresultatene av de kit-uavhengige kontrollene kan vise avvikende resultater med forskjellige batchnummner. Dersom analyseresultatene for den kit-uavhengige kontrollen etter repetert testing med en ny "batch" samsvarer med resultatene fra første oppsett, godkjennes oppsettene.

10.6 Avviksbehandling

Avvik fra normalverdiene for de kit-uavhengige kontrollene behandles etter laboratoriets oppsatte prosedyre for avviksbehandling.

11 Kritisk blikk på analyse-tallverdiene

Gunnar Haukenes, Avdeling for mikrobiologi og immunologi, Haukeland sykehus

11.1 Titreringsmetoder

11.1.1 Fortynningsrekker

Mest anvendt er to-fold, 8-16-32 osv. (2^3 - 2^4 - 2^5) og 10-20-40 osv. (10×2^0 - 10×2^1 - 10×2^2 eller 10^1 - $10^{1.3}$ - $10^{1.6}$), event. halv eller hel logaritmisk rekke.

11.1.2 Avlesning

KBR avleses diskontinuerlig dvs. bare én verdi for hvert titertrinn. Ved multiplisering med hemningsgraden (0,9-0,8-0,7 osv. eller 0,75-0,5-0,25 osv.) vil en få en mer kontinuerlig avlesning med henholdsvis 8 eller 3 verdier mellom titertrinnene (sml. AST). Ved å skyte inn mellomtrinn, f.eks. 16-32-48-64, kan rekken bli aritmetisk.

11.1.3 Middelvei

Ved to-fold fortynning, 16-32-64 osv. er avstandene mellom titertrinnene ulike. Aritmetisk middelvei (AM) av f.eks. 16 - 32 - 64 blir 37,3 som er matematisk korrekt. Pga. asymmetrisk fordeling og mulig titreringsfeil ett trinn opp eller ned, bør geometrisk middel (GM) anvendes. For verdiene 2^4 - 2^5 - 2^6 blir middeltallet av eksponentene 5, dvs. GM = 32. GM er alltid lavere enn AM. Ved kontinuerlig avlesning og/eller aritmetisk rekke (16-32-48-64) anvendes AM.

11.1.4 Signifikant titerstigning

Signifikant stigning i parallelloppsett krever minst 4x økning ved diskontinuerlig avlesning (eks. KBR). En 2x økning kan imidlertid romme signifikant titerstigning hvis laveste titer er nær verdien under og høyeste verdi nær verdien over. Motsatt kan to sera med titre 32 og 64 ha samme antistoffmengde hvis verdiene ved fintitrering ligger på grensen mellom 32 og 64. Hvis det er viktig, bør det derfor utføres gjentatte oppsett og/eller "tettere" titrering for å avsløre event. signifikant titerstigning ved 2x økning. Ved kontinuerlig avlesning representerer 2x økning av titer en signifikant stigning.

11.2 Enzymmerkingsmetoder

11.2.1 Optical density (OD)

OD ("absorption", "absorbance", "extinction") fremkommer bl.a. av forholdstallet mellom logaritmen til transmisjonen i kontrollen og logaritmen til transmisjonen i prøven (Lambert-Beer's lov). OD er således proporsjonal med negativ logaritme til transmisjonen, med mengde konjugat og derved med mengde serumantistoff innen visse grenser. Transmisjonen måles etter en viss tid (OD), eller tiden for å oppnå en viss transmisjon registreres idet spaltningshastigheten ("rate", f.eks. i Axsym) er proporsjonal med mengde spaltet substrat og serumantistoff. For gjennomsnitt anvendes AM basert på fortytning til lave OD-verdier.

11.2.2 Signifikant antistofføkning

Signifikant antistofføkning i parallelt oppsett krever minst 2x økning av OD-verdien innen snevre grenser for lineær proporsjonalitet mellom OD-verdi og serumantistoffmengde. Proporsjonaliteten er god nær cut-off hvor en 2x økning av antistoff gir fordobling av OD, men avtar til henimot 1x når OD-verdien nærmer seg 2.0. Ved usikkerhet mht. signifikant titerstigning bør de to sera fortynnes til OD-verdier nær cut-off. En sjelden gang sees et prosonelignende fenomen idet OD-verdien øker ved fortytning.

Eksempel (fra IgG anti-VZV "titer"stigning med cut-off 0,2): Serum 1: OD = 1.19, serum 2 (etter 1 uke): 1,99. Dette skulle tallmessig tilsvare 1,7 x økning av antistoffmengden og egentlig ikke signifikant. Ved 1:10 fortytning av serum 1 blir OD 0,26, og 1:100 fortytning av serum 2 gir OD = 0,33, dvs. ca 13x antistofføkning.

Ved bruk av deltaverdier (OD-prøve minus OD-kontrollantigen) har en samme problem. En deltaverdi på 0,2 fremkommet som 1,0 minus 0,8, vil bli altfor lav og er kanskje 0,5 nær cut-off. Også her kan en få et prosonelignende funn dersom antigenkontrollen gir høy verdi ved standardfortyning og lavere ved fortytning.

Avlesning av "rate" som i Axsym har flere fordeler. Mens OD-verdiene bare spenner over maksimalt 10x cut-off (f.eks. fra 0,2 til 2,0), registrerer f. eks. Axsym et mye bredere område (f. eks. fra 10 til 500 IU/ml, dvs. 50x). En annen fordel er at det er lineær proporsjonalitet mellom avlest verdi og antistoffmengde over hele området.

11.2.3 Standardavvik (SD)

Ved diskontinuerlig avlesning beregnes SD om mulig av eksponentverdiene, men dette er av liten verdi pga. de store avstandene mellom titertrinnene. Ved kontinuerlig avlesning anvendes titer- eller OD-verdiene. SD basert på et begrenset antall paralleller kan være veiledende over tid for laboratoriet, men gir ingen absolutt verdi for nøyaktighet eller signifikansgrenser. For ELISA er det anbefalt 15 - 30 paralleller for å oppnå tilstrekkelig pålitelige SD-verdier (ca. 10-20 % avvik). Standardfeil (SE) = $SD : \sqrt{\text{antall}}$ undersøkelser gir opplysning om nøyaktigheten av SD-verdien idet den blir lavere med flere undersøkelser.

11.3 Andre metoder

Ved plaquereduksjonstest må alle fortytninger med tellbare plaques taes med ved beregning av reduksjonsgraden. Nøytralisasjon av infektivitet i øvrige cellekulturer beregnes ved Reed-Muenchs eller Kärbers metode, sistnevnte muliggjør også beregning av SD.

11.4 Fabrikantens angivelser

Fabrikantene gir ikke opplysning om manglende proporsjonalitet mellom OD-verdi og antistoffmengde ved høyere OD-verdier eller om lave deltaverdier ved høy bakgrunn, og deres øvrige informasjon tyder ikke alltid på full innsikt i vesentlige sider av serologisk diagnostikk.

11.5 Spørsmål

- Det vil være en fordel for sammenligning av resultater, bl.a. i ringtest, om alle laboratorier brukte samme fortynningsrekke. Kan de som anvender rekken 10-20-40 osv., tenke seg å gå over til 8-16-32?
- Bør vi forlange at leverandører av ELISA kits angir OD-området for lineær proporsjonalitet med antistoffmengde?

12 Vurdering av serologiske analyseresultater i diagnostikken: Trouble-shooting

Svein Arne Nordbø, Avdeling for mikrobiologi, St Olavs hospital HF, Trondheim

12.1 Generelt

Det er ikke uvanlig at det i serologisk rutinediagnostikk fremkommer resultater som samsvarer dårlig med de kliniske opplysningene. Noen ganger kan det påvises spesifikt IgM eller høyt titer mot flere agens i samme serumprøve, og det kan være vanskelig å avgjøre om det dreier seg om kryssreaksjoner, polyklonal aktivering eller reelle multiple infeksjoner. Andre ganger kan det være vanskelig å påvise spesifikke antistoffer mot det aktuelle agens, til tross for typisk klinikk og evt. tidligere agenspåvisning.

Det er derfor viktig at de som er ansvarlige for diagnostikken har god kjennskap til de enkelte testene og instrumentene som disse analysene blir kjørt på. Det tar ofte tid å opparbeide slik erfaring, og det kan derfor være tilrådelig å ikke skifte tester for ofte uten at det er godt faglig begrunnet.

Uventede resultater bør alltid repeteres! Mangel på reproducerbarhet er en av de hyppigste årsakene til feiltolkninger. I tillegg kan det være aktuelt å utføre supplerende analyser, undersøke tidligere prøver hvis slike er tilgjengelige, eller be om ny prøve. Serokonversjon eller signifikant titerstigning er ofte et bedre diagnostisk kriterium på en primærinfeksjon enn påvisning av spesifikt IgM i en enkelt prøve. Høye IgG titre alene bør tolkes med stor varsomhet.

Det er også viktig å kontrollere holdbarheten på reagensene, samt batchnummer.

12.2 Feilkilder før testing

Feildiagnostikk kan skyldes en rekke ulike faktorer. Av og til kan det skyldes immunologiske faktorer hos pasientene (autoimmunitet, immundefekter eller -sykdommer, parasittinfeksjoner etc.) eller behandlingen de har fått (immunsuppresjon, transfusjoner, immunoglobuliner, vaksiner, dialyse, cytostatika etc.).

Det er viktig å utelukke forbyttning av prøver. Dette kan gjøres ved å undersøke originalmaterialet (prøveglasset eller arkivrørret), eller teste andre sera fra samme pasient. Hvis et positivt resultat får alvorlige konsekvenser for pasienten (f.eks. HIV-antistoff), bør det tas en ny prøve for å verifisere funnet.

12.3 Feilkilder ved serologiske analyser

Ulike testmetoder kan ha forskjellige og særegne feilkilder, og det vil føre for lang å gå i detaljer på de enkelte metodene. Komplementbindingsreaksjonen er diskutert på et tidligere strategimøte, og det henvises til heftet "Komplementbindingsreaksjonen for påvisning av serumantistoffer" utgitt april 1996 (ISBN: 82-7364-098-1) s. 14-16. En del praktisk viktige poenger vil derimot bli omtalt for noen av de aktuelle testene.

12.3.1 Antigen

De fleste serologiske testene som benyttes i dag er arts- eller genusspesifikke. Bare noen få tester som benytter ikke-artsspesifikke antigener er fortsatt i bruk. Eksempler på dette er reagintester (syfilis), heterofile antistoffer (EBV) og kuldeagglutinerer (*Mycoplasma pneumoniae*). Sensitiviteten og spesifisiteten til disse testene er varierende og bør tolkes med varsomhet, og supplerende testing er ofte nødvendig.

Kvaliteten på antigenene som benyttes i de ulike testene er helt avgjørende for både sensitivitet og spesifisitet. Dårlig rensede antigener av hele mikroben gir ofte lavere spesifisitet enn om man benytter enkelte viktige epitoper fra den aktuelle mikroben.

Eksempel. Såkalte "typespesifikke" ELISA-tester som benytter helviruslysat av HSV-1 og HSV-2 stammer er i praksis ikke i stand til å skille mellom HSV-1 og HSV-2-spesifikke antistoffer.

Rekombinante antigener og syntetiske peptider er ofte benyttet for å øke spesifisiteten av testene, men dette kan lett gå ut over sensitiviteten hvis man ikke har med tilstrekkelig antall epitoper som dekker de fleste stammevariasjonene (kfr. utviklingen av sensitiviteten til HIV-testene). Rekombinante antigener som gir ekspresjon av relevante overflateantigener (som f.eks. HBsAg) har ofte en god spesifisitet, mens dette ikke alltid er tilfelle med rekombinante LPS-antigener (som f.eks. diverse Chlamydiatester). En viss kryssreaktivitet kan forekomme mellom agens innen samme familie (f.eks. EBV og CMV), men dette er avhengig av hvordan antigenene er fremstilt og hvilken metode som brukes.

12.3.2 Immunglobulin

Immunglobulin-spesifikke tester er mye brukt i rutinediagnostikken. Dette gjelder spesielt IgM, IgG og IgA. Tester som påviser spesifikke IgM-, og til en viss grad også IgA-antistoffer, kan være nyttige for å diagnostisere en aktuell infeksjon. Når det gjelder IgM-testene er μ -capture prinsippet (anti-humant IgM som "catching-antibody") å foretrekke fremfor indirekte tester som benytter klassespesifikt konjugat til påvisningen. De indirekte testene har lav sensitivitet for IgM i nyfødtsera fordi store mengder maternelle IgG-antistoffer kan utkonkurrere barnets egenproduserte IgM-antistoffer om bindingen til det spesifikke antigenet i testen. I tillegg kan revmatoid faktor (RF) gi falske positive IgM-reaksjoner i de indirekte testene dersom spesifikt IgG er tilstede. De fleste indirekte IgM-tester inkluderer derfor et RF og/eller et IgG absorpsjonstrinn før selve testingen.

Konjugatenes spesifisitet er vanligvis god, men enkelte produsenter har hatt problemer med å fremstille rene anti-IgA konjugater. Disse konjugatene kan i tillegg ha en viss reaktivitet overfor IgG, slik at de vil kunne gi en binding hvis nivået av IgG er høyt nok.

Svært høye antistofftitre kan gi en prosone eller prosonelignende effekt (falskt negativt resultat) i enkelte tester. Mest utsatt er agglutinasjonstestene. Det er derfor viktig å reteste "negative" sera i høyere fortyngninger hvis man har en slik mistanke.

12.4 Supplerende tester

Serologiske analyser som får spesielt store konsekvenser for pasientene hvis testen er positiv, verifiseres ofte med "konfirmasjonstester".

12.4.1 HIV

En positiv screeningtest på HIV konfirmeres med Western blot som benytter rensset viruslysat som antigen. De båndene som evt. måtte fremkomme kan variere fra produsent til produsent, og man kan ikke uten videre sammenligne mønstrene mellom ulike kits. Kriteriene for positivitet kan også variere, og tidlig i serokonversjonsfasen kan flere av de spesifikke båndene mangle. Påvisning av HIV-RNA med RT-PCR vil derfor være avgjørende for en tidlig diagnose i disse tilfellene.

12.4.2 HCV

Spesifikke antistoffer mot hepatitt C virus (HCV) påvises ved at minst 2 av de 4 båndene på RIBA er reaktive. Det er imidlertid ikke uvanlig at pasienten er viremisk (positiv RT-PCR) selv om kun ett av båndene (hyppigst c33c) er tilstede. Et slikt mønster kan persistere over år, og er ikke bare et fenomen som opptrer i forbindelse med serokonversjon.

12.4.3 HBV

En positiv HBsAg test verifiseres vanligvis med en enkel nøytralisasjonstest. HBsAg-titret kan imidlertid være svært høyt, slik at man må teste fortynt serum for å få frem den nøytraliserende effekten av antistoffet som tilsettes. Produsentene av disse testene har gode instruksjoner for nøytralisasjon av HBsAg, og det er viktig å følge disse prosedyrene nøye. I ett tilfelle har vi fått "konfirmert" en falsk positiv HBsAg reaksjon ved nøytralisasjon fordi produsenten hadde brukt to sera fra forskjellige dyr i kitet. Det er derfor viktig at også andre HBV-markører (anti-HBc, HBeAg/anti-HBe) blir undersøkt. Hepatitt B serologien kan være meget komplisert å tolke i enkelte tilfeller, og utvidet testing med genteknologiske metoder (PCR, sekvensering) kan av og til være påkrevd. Dette er en oppgave for referanselaboratoriene.

12.5 Instrumenter

Flere og flere serologiske tester kjøres i dag på utstyr som er halv- eller helautomatisert. Noen systemer er åpne og relativt enkle å kontrollere. Verre er det med de helautomatiserte analysemaskinene hvor store deler av analyseprosessen foregår skjult inne i maskinen. Denne type utstyr har innebygget en rekke sikkerhetssystemer som gir feilmeldinger eller stopper analysen dersom uventede feil oppstår. Problemet er at laboratoriepersonellet har begrenset innsikt i mulige feilkilder ved disse analysene, og det er derfor viktig å kontrollere uventede resultater med alternative analysemetoder.

Noen av de viktigste tekniske feilkildene er feilpipettering og utilstrekkelige vaskeprosedyrer. Pga. faren for "carry-over" etter en positiv prøve, bør man alltid benytte instrumenter med engangsspisser i den pasientrettede diagnostikken, selv om dette ikke er noen 100% garanti for at fenomenet ikke kan oppstå i praksis.

Regelmessig vedlikehold og service er en selvfølge. Spesielt viktig er det å inspisere slangesystemene for lekkasjer og bakterievekst. Vi har opplevd at bakterievekst har forårsaket

høy bakgrunn og lite reproduerbare resultater. For å få pålitelige resultater måtte vaskingen foregå manuelt inntil slangene ble skiftet.

12.6 Konklusjoner

Presis serologisk diagnostikk er avhengig av gode tester og rutiner for analysene. Det er viktig å etablere adekvate rutiner som forhindrer og evt. kan avsløre prøveforbytting. Inngående kjennskap til de ulike analysenes egenskaper er viktig for bedømmelsen av resultatene. I tvilstilfeller er det viktig å kontrollere at resultatene er reproduerbare, og det kan være nødvendig å utføre supplerende tester eller undersøke flere sera fra samme pasient samtidig. Det er lite tilrådelig å basere klinisk diagnostikk på kun én IgM-test alene dersom man ikke kjører en IgG eller en total-Ig test mot samme agens i tillegg. Av praktiske årsaker velger mange å besvare de serologiske resultatene fortløpende, men i enkelte tilfeller kan det være hensiktsmessig å avvente andre serologiske testresultater før den endelige besvarelsen gis ut.

13 Tolkning og rapportering

Olav B. Natås, Mikrobiologisk avdeling, Helse Stavanger HF

Reidar Hjetland, Mikrobiologisk avdeling, Helse Førde HF, Sentralsjukehuset

13.1 Rapporten

En virologisk/serologisk svarrapport skal være nøytral, klar, entydig og objektiv. Den skal ha tittelen "Svarrapport" og skal inneholde navn og adresse til laboratoriet, navn og adresse til rekvirenten, pasientdata, prøveløpenummer, prøvemateriale, dato for mottak av prøven og dato for utførelse av analysen, analysebetegnelse, analyseresultat, kommentar, og til sist navnet på den som har godkjent resultatet (ISO 17025). Virologisk/serologiske svarrapporter bør i størst mulig grad være sammenlignbare når det gjelder betegnelser på analyser, analysemetoder, resultat og ordbruk ellers. En bør bare bruke forkortelser som er innarbeidet i litteraturen.

13.1.1 Analysebetegnelse

Analysebetegnelsen angir hvilken test som er utført, f.eks. hepatitt Bs antigen. Ved undersøkelse på immunglobulinklasser (IgG, IgM, totalantistoff), må dette fremgå av analysebetegnelsen. Når en bruker ferdige testkit, bør navn på testen og firmaet oppgis. Ellers kan en skrive analysemetoden som er benyttet.

13.1.2 Analyseresultat

Analyseresultatet bør skrives med uthevet skrift. Mange betegnelser brukes i analyseresultatet, eksempelvis: Negativ, positiv, reaktiv, påvist, ikke påvist, grenseverdi, gråsone, intermediært titer, lett forhøyet titer, lavt antistoffnivå, sterk positiv. En må bruke den betegnelsen som passer best i enhver situasjon. Ofte trengs videre kommentarer til rekvirenten. Det kunne være behov for en viss samkjøring mellom avdelingene når det gjelder bruk av betegnelser i resultatene. Graden av positivitet bør angis når dette er mulig, f.eks. med titer, IE/ml, index, prosent av cut-off, ganger cut-off, eller som brøk med cut-off som nevner. Normalverdier kan oppgis ved de analyser der slike finnes.

13.2 Tolkning og kommentarer

Kommentarer er viktige ved enkelte funn og krever inngående kunnskaper i faget.

Kommentaren kan være en ren tolkning av funnet, f.eks. "høyt titer forenlig med aktuell

infeksjon”, eller ”tvilsom klinisk betydning”. Graden av tvil bør komme frem ved formuleringer som: funnet viser, funn forenlig med, funnet kan tyde på osv. Kommentaren ”ny prøve ønskelig” må ikke benyttes unødvendig. Hvis en ber om ny prøve, bør det fremgå hvorfor. Alvorlige funn bør kontrolleres med ny prøve for å utelukke prøveforveksling. I kommentarfeltet kan en også gi opplysninger om smittefare, meldeplikt, immunstatus, eller behov for vaksine når det er relevant.

Det vil alltid være et skjønnsspørsmål hvor mye en skal kommentere, og det må være tillatt å vurdere rekvirenten i så måte. Enkelte blander for eksempel sammen HCV og HBc antistoff, og noen vet ikke forskjell på antigen og antistoff. Hvis rekvirenten stiller et konkret spørsmål skal dette besvares ut fra funnet hvis mulig. Rekvisisjoner uten kliniske opplysninger bør kun kommenteres ved viktige funn. En kan ellers kommentere med ”kliniske opplysninger ikke oppgitt”.

13.2.1 Standardkommentarer

Bruk av lister med standardkommentarer med egne koder letter arbeidet og egner seg best der betydningen av funnet er sikker.

13.2.2 Tilleggsundersøkelser

Laboratoriet kan utføre tilleggsundersøkelser ut fra epidemiologiske forhold og kliniske opplysninger.

13.2.3 Oppsplittet svar

Hvis det tar lang tid før svaret på en av testene som er rekvirert foreligger, bør en splitte opp svaret og sende tilleggsvar senere. En bør da kommentere med f.eks ”svar på hepatitt C PCR følger om en uke”.

13.2.4 Telefonisk svar

Viktige funn og funn der en ønsker tilleggsinformasjon ringes. Det kan f.eks. være mistanke om utbrudd, spesielle smitteforhold eller der en av andre årsaker finner grunn til å diskutere funnet nærmere med rekvirenten. På remissen skal alltid skrives når svaret ble ringt, navnet på den som mottok svaret og signatur til den som ringte.

13.3 Spørsmål.

- Ved hvilke viktige funn bør en be om ny prøve for å unngå prøveforbytting?
- Hvilke opplysninger om analysen bør en oppgi i svarrapporten: Analysemetode, navn på fabrikanten, fabrikantens proprietære navn på analysen?
- I hvor stor utstrekning skal en bioingeniør kunne kommentere et analyseresultat?
- I hvilken grad bør en se an rekvirentens kunnskaper ved kommentering?
- Hvordan skal en forholde seg når pasienten ringer for å få vite svaret?
- I hvilken grad bør analysebetegnelse, benevnelse ved gradering av resultat samt ordvalg ved kommentering harmoniseres mellom laboratoriene? Hvordan kan en slik harmonisering evt. komme i stand?

Sentralsjukehuset i Sogn og Fjordane
Mikrobiologisk avdeling
6800 Førde

Avdelingsoverlege N.N
Mikrobiologisk avdeling
.....
.....

Journal nr.

Dato

Dato.....

Virologisk/serologisk strategimøte 2001

Årets virologisk/serologiske strategimøte holdast 1. november 2001. Temaet i år er kvalitetskontroll av serologiske analysar.

Underteikna skal ha eit innlegg om "vurdering av analyseresultata i diagnostikken", og i samband med dette sender vi ut seks sjukehistoriar med funn. Vi er interessert i å vite korleis ditt laboratorium ville ha svart ut og kommentert funna. Aller helst ønskjer vi svara i form av ei ordinær utskrift frå dykkar EDB laboratoriesystem. Om dette ikkje let seg gjere, ber vi dykk fylle ut svara på vedlagte skjema. Vi er først og fremst interessert i å sjå på måten å svare på, og omfanget av kommentering, ikkje om svaret er fagleg "riktig". Ta evt. kontakt med underteikna ved spørsmål.

Resultata vil bli lagt fram anonymt på strategimøtet.

Vi ber om at svara sendast Reidar Hjetland innan 1. september.

Beste helsing

Reidar Hjetland

Olav B. Natås
(sign.)

13.4 Kasuistikkar

Helst vil vi at de skal legge inn desse som illuderte pasientprøvar i dykkar EDB lab.system, legge inn aktuelle svar med kommentarar, og sende utskrift av dette til oss. Dersom dette er praktisk svært vanskeleg, kan de i staden fylle ut vedlagte skjema, eit for kvar kasuistikk. Ver då god å ta med alt som vil kome fram på ei vanleg EDB-utskrift frå dykkar laboratorium.

Det er ikkje sikkert at dei nemde analysane er nøyaktig det dykkar laboratorium ville ha utført, difor:

- Dersom det er analysar de ikkje ville ha utført, berre kutt dei ut.
- Dersom det er analysar de måtte ha sendt til referanselab. for å få utført, (td. Western blot), lat som om det er utført.
- Dersom de har andre analysevariantar enn det vi har ført opp, bruk desse i staden, med tilsvarende resultat.
- Det er her lagt inn resultat på enkelte supplerande testar. Desse brukast om det er naturleg for dykk. Legg også inn evt. supplerande testar de ville ha utført på eige initiativ.

Nr	Pasient-data	Kliniske opplysningar	Rekvirerte analysar	Resultat
1	Kvinne, 50 år	Monartritt kne	Yersinia antistoff	Yersinia O3 direkte agglutinasjon: titer 80 (eller 64). For dei som brukar ELISA: Grenseverdi i IgG/IgM/IgA.
2	Kvinne, 25 år	Gravid 10 veker, screening	Anti-HIV Rubella IgG	Anti-HIV screening: Reaktiv (150% av cut-off) Alternativ screeningstest: Reaktiv (150% av cut-off) HIV WB: p24+, elles negativ. Rubella IgG: 9 IE
3	Mann, 28 år	Stoffmisbruk. ALAT 60	Anti-HCV HBsAg anti-HBc anti-HAV IgM	Anti-HCV screening: Positiv (3000% av cut-off) HCV RIBA (eller alt. verifikasjonstest): Positiv, alle band. HCV RNA PCR: Negativ HBsAg: Negativ. Anti-HBc total eller IgG: Positiv (40% av cut-off i konkurranse-ELISA el. tilsv.) Anti-HBs: Negativ. Anti-HAV IgM: Negativ
4	Mann, 60 år. Prøve tatt i oktober	Influensa-liknande sjukdom	Influensa antistoff	Influensa A KBR: titer 128 Influensa B KBR: titer 16
5	Kvinne, 60 år	Artralgi	Borrelia antistoff	Borrelia IgG: Negativ Borrelia total-Ig: Svakt positiv Borrelia IgM: Positiv (160% av cut off)
6	Gut, 14 år	Ingen opplysningar	EBV-antistoff CMV-antistoff AST	EBV VCA IgG: Positiv (300% av cut-off) EBV VCA IgM: Positiv (150% av cut-off) Anti-EBNA: Negativ. Mononukleose hurtigstest: Positiv Paul-Bunnells reaksjon etter abs. m/ marsvinnre: Normalt titer (16 eller 20) CMV IgG eller total: Positiv CMV IgM: Positiv (150% av cut-off) Anti-Streptolysin O: titer 800

13.5 Oppsummering av svar på utsende kasuistikkar

Kasus 1

1	Kvinne, 50 år	Monartritt kne	Yersinia antistoff	Yersinia O3 direkte agglutinasjon: Titer 80 (eller 64). For dei som brukar ELISA: Grenseverdi i IgG/IgM/IgA
---	------------------	-------------------	-----------------------	--

Analyse- nemning	Antigen	Yersinia enterocolitica O3: 4/14 Yersinia enterocolitica: 1/14 Yersinia O3: 4/14 Yersinia: 5/14
	Metodeprinsipp anført	ELISA: 1/3 Aggl: 1/12 Totalt: 2/15
	Immunglobulinklasse anført	ELISA: 3/3 Agglutinasjon: 0/12
	Fabrikat anført	ELISA: 1/3 Aggl: 0/11
Numerisk svar	Titer-testar: Titer anført	12/12
	EIA/MEIA grense: OD eller liknande anført?	2/3
Språkleg svar	Nemning av grensetiter	Lavt titer: 1/12 Lavt antistoffnivå: 1/12 Tvilstomt forhøyet: 2/12 Moderat titer: 2/12 Tvilstomt pos.: 1/12 Lett forhøyet titer: 1/12 Positiv (lavt titer): 1/12 Høyt titer: 2/12 Ingen: 1/12
Kommentar	Tilrå ny prøve	11/16
Tilleggs- analysar	Tilleggsrekvirere analyser for andre agens som kan gi liknande sjukdom	Nei: 10 Ja: 5 1: AST og a-DNaseB, 1: Borrelia, 1: uspesifisert, 1: Salmonella a.s., 1: Chlam. KBR
	Tilrå faecesprøve	Ja: 3/15 Nei: 12/15

Kasus 2

2	Kvinne, 25 år	Gravid 10 veker, screening	Anti-HIV Rubella IgG	Anti-HIV screening: Reaktiv (150% av cut-off) Alternativ screeningstest: Reaktiv (150% av cut-off) HIV WB: p24+, elles negativ Rubella IgG: 9 IE
---	------------------	----------------------------------	-------------------------	---

RUBELLA			
Numerisk svar	EIA/MEIA grense: OD el. I. anført?	9 IE/l: 5-10 IE/l:	8/16 1/16
Språkleg svar	Nemning av grenseverdi EIA/MEIA	Antistoff ikke påvist: Negativ: Negativ, antistoff ikke påvist: Gråsone: Ikke immun: Grenseverdi: Intermediært titer: Lavt antistoffnivå/mengde: Tvilstomt forhøyet: Positiv: Positiv (antistoff påvist):	1/16 3/16 1/16 2/16 1/16 2/16 1/16 2/16 1/16 1/16 1/16
Kommentar	Vurdering av immunstatus Råd om vaksinasjon		12/16 11/16
Anti-HIV			
Språkleg svar	Bruk av "reaktiv" på positiv anti-HIV screeningstest	Usikkert resultat: Inkonklusivt resultat: Antistoff påvist: Positiv: Positiv (antistoff påvist): Reaktiv: Inga nemning, erstatta av meir omfattande komm:	1/ 17 1/17 2/17 1/17 1/ 17 2/17 9/17

Kasus 3

3	Mann, 28 år	Stoff-misbruker, ALAT 60.	Anti-HCV HBsAg anti-HBc anti-HAV IgM	Anti-HCV screening: Positiv (3000% av cut-off) HCV RIBA (el.alt. verifikasjonstest): Positiv, alle band. HCV RNA PCR: Negativ HBsAg: Negativ. Anti-HBc total eller IgG: Positiv (40% av cut-off i konkurranse-ELISA eller tilsvarende) Anti-HBs: Negativ Anti-HAV IgM: Negativ
---	-------------	---------------------------	---	---

Anti-HCV			
Analyse-nemning	Fabrikat anført		1/18
	Generasjon/versjon anført	3. gen. eller liknande	4/18
	Proprietært testnavn anført		1/18
	Proprietært analysemaskin-namn anført		1/18
Numerisk svar	EIA/MEIA positiv: OD el. l. anført?		2/18
Kommentar	Vurdere smittefare	Påpeikar at smittefare ikkje kan utelukkast	5/18
	Gjere merksam på evt. meldeplikt anti-HCV		3/18
	Tilrå ny prøve for å utelukke prøveforbyting ved HCV		4/18
Tilleggs-analysar	HCV RIBA	Ja:	15/16
	HCV PCR	Ja:	16/17
Anti-HAV IgM			
Numerisk svar	EIA/MEIA negativ: OD el. l. anført?		0/17
Språkleg svar	Nemning av negativt EIA/MEIA-svar	Negativ/antistoff ikke påvist: Ikke påvist: Negativ: Antistoff ikke påvist:	6/18 2/18 7/18 3/18
HBV			
Kommentar	Vurdere smittefare	"Ingen smittefare":	1/17
		"Fortsatt smittefarlig":	1/17
		Ikke kommentert smittefare:	15/17
Tilleggs-analysar	Anti-HBc IgM ved isolert positiv a-HBc	Ja:	7/16
	Anti-HBe ved isolert positiv anti-HBc	Ja:	6/15
	HBV PCR ved isolert positiv anti-HBc	Ja:	4/15
ANNET			
Tilleggs-analysar	Tilleggsrekvirere analyser for andre agens som kan gi liknande sjukdom	Ja: EBV+CMV	1/18

Kasus 4

4	Mann, 60 år. Prøve tatt i oktober	Influensa- liknande sjukdom	Influensa antistoff	Influensa A KBR: titer 128 Influensa B KBR: titer 16
---	--------------------------------------	-----------------------------------	------------------------	---

INFLUENSA A			
Språkleg svar	Nemning av positivt titer	Lavt antistoffnivå: 1/12 Intermediært titer: 1/12 Moderat titer: 1/12 Positiv: 1/12 Høyt titer: 6/12 Ingen (kommentar): 2/12	
Kommentar	Påpeike lav pretest sannsynlegheit (influenza utanfor vanleg sesong)	Usikker betydning: 6 /12 Ekspisitt om utanfor sesong: 1/12 Aktuell eller nyleg gjennomgått infeksjon: 5/12	
Tilleggs-analysar	Tilleggsrekvirere analyser for andre agens som kan gi liknande sjukdom	Ingen	

Kasus 5

5	Kvinne, 60 år	Artralgi	Borrelia antistoff	Borrelia IgG: Negativ Borrelia total-Ig: Svakt positiv Borrelia IgM: Positiv (160% av cut off)
---	---------------	----------	--------------------	---

Kommentar	Påpeike mogleg uspesifikk isolert Borrelia IgM	16/16
	Tilrå ny prøve	14/16
Tilleggs-analysar	Tilleggsrekvirere analysar for potensielt kryssreagerande agens (syfilis, EBV)	Ingen: 14/17 RPR 2/17 RPR og mononukleose hurtigtest 1/17

Kasus 6

6	Gut, 14 år	Ingen opplysningar	EBV-antistoff CVM-antistoff AST	EBV VCA IgG: Positiv (300% av cut-off) EBV VCA IgM: Positiv (150% av cut-off) Anti-EBNA: Negativ Mononukleose hurtigtest: Positiv Paul-Bunnells reaksjon etter abs. m/ marsvinnyre: Normalt titer (16 eller 20) CMV IgG eller total: Positiv CMV IgM: Positiv (150% av cut-off) Anti-Streptolysin O: titer 800
---	---------------	-----------------------	---------------------------------------	---

Analyse- nemning	Divergerande språkbruk same analyse?	Anti streptolysin test: 2/13 Antistreptolysin-titer: 3/13 Antistreptolysin-titer (AST): 1/13 AST: 5/13 Streptolysin antistoff: 2/13
Konsekvens av manglande opplysningar	La vere å utføre rekvirerte testar ved manglande kliniske opplysningar	Ingen testar utført: 1/17 1 test, ikkje andre: 1/17
	Berre påpeike manglande opplysningar	9/17
	Ingen merknad eller konsekvens av manglande opplysningar	6/17
Kommentar	Positiv CMV IgM v/EBV-infeksjon Påpeike tvilsom/usikker	8/13
	Positiv AST v/EBV-infeksjon Påpeike tvilsom/usikker	2/14

Alle kasus

Kliniske opplysningar	Kliniske opplysningar referert på svararket?	Ja, på alle kasus: 5/19 På enkelte kasus: 1/19 Nei: 13/19
--------------------------	---	---