

Validering og verifikation af amplifikationsbaserede analyser i klinisk mikrobiologi

EN VEJLEDENDE HÅNDBOG UDARBEJDET AF MOLNET, EN ARBEJDSGRUPPE
UNDER DANSK SELSKAB FOR KLINISK MIKROBIOLOGI (DSKM)

Indhold

1. Forord	2
2. Baggrund og definition af begreber	2
2.1 Acceptkrav	3
2.2 Verifikation	3
2.3 Validering	3
2.4 Kvalitative analyser	4
2.5 Kvantitative analyser	4
2.6 Referencemetoder	4
2.7 Referencemateriale	4
3 Specifikke krav til verifikation/validering indenfor amplifikationsbaseret diagnostik i klinisk mikrobiologi .	5
3.1 Målekorrekthed	5
3.2 Præcision	7
3.3 Robusthed	9
3.4 Målenøjagtighed	9
3.5 Måleusikkerhed	9
3.6 Analytisk sensitivitet	10
3.7 Detektionsgrænse	10
3.8 Kvantificeringsgrænse	11
3.9 Analytisk specificitet	12
3.10 Diagnostisk sensitivitet og specificitet	12
3.11 Måleinterval	13
4 Øvrige relevante parametre	13
4.1 Enheder	13
4.2 Validering/verifikation af apparatur og reagenser	13
4.3 Metodesammenligning og information til rekvirenter	14
4.4 Granskning af verifikation-/valideringsrapporter	16
4.5 Krav til tillægsrapporter	16
5 Referencer	18
Bilag 1: Oversigt over nødvendige målepunkter i forbindelse med verifikation/validering	21
Bilag 2: Forslag til håndtering af brud på CE-IVD-mærkning i forbindelse med en verifikation	22
Bilag 3: Faktorer til estimering af måleusikkerhed, som ikke er målbare eller som er svært målbare	32

1. Forord

Dette dokument skal ses som en vejledende anbefaling for klinisk mikrobiologiske laboratorier, der ønsker at validere/verificere amplifikationsbaserede analyser i forhold til ISO15189 standarden, Medicinske laboratorier – Krav til kvalitet og kompetence (herefter kaldet ISO15189), og skal altså ikke ses som en endegyldig facitliste. Arbejdet med dokumentet er startet da DS/EN ISO15189:2013 var gældende. I 2023 blev den reviderede udgave DS/EN ISO15189:2023 udgivet, men det er ikke forfatterens opfattelse, at den nye udgave ændrer i de anbefalinger, der er beskrevet i dette dokument. Dokumentet er udarbejdet af DSKM-arbejdsgruppen MolNet, som så et behov for en guideline, der dækker klinisk mikrobiologi. Dokumentet beskriver nøgleelementer, der bør vurderes i verifikations- og valideringsprocessen, for at sikre kvaliteten af de molekylærbiologiske analyser. Dokumentets bilag 1 kan desuden bruges som en hjælp til at designe de forsøg, der kan være nødvendige for at kunne implementere henholdsvis CE-IVD-godkendte (se afsnit 2. Baggrund og definition af begreber for en nærmere beskrivelse), kommercielle analyser samt analyser udviklet af laboratoriet selv således, at disse lever op til de krav, der er angivet i ISO15189. De steder hvor der i dokumentet er opstillet krav til f.eks. antal prøver, der skal analyseres, skal disse altid betragtes som minimumskrav. Endeligt giver dokumentet eksempler på, hvordan laboratoriet bør håndtere ændringer fra producentens anbefalinger på CE-IVD-mærkede analyser eller ændring af eksisterende validerede analyser (bilag 2). Dokumentet dækker som udgangspunkt verifikation/validering af analyser udført i det klinisk mikrobiologiske centrallaboratorium. Mange elementer i dokumentet vil dog, efter MolNets mening, kunne overføres til PoCT-udstyr, hvor analysen udføres uden for det klinisk mikrobiologiske centrallaboratorium. For generelle anbefalinger vedrørende implementering og kvalitetssikring af PoCT-udstyr henvises til DSKM's anbefaling vedrørende PoCT [1].

Denne håndbog er udarbejdet mens CE-IVD-direktivet var gældende, men indførelsen af IVDR-forordningen, har ikke den store indflydelse på hvordan CE-IVD-mærkede kit og reagenser skal verificeres i laboratoriet i forhold til ISO15189. Det er dog uafklaret i hvilket omfang valideringen af in-house-metoder påvirkes af indførelsen af IVDR-forordningen.

Følgende medlemmer af arbejdsgruppen har bidraget til dette dokument:

Ledende molekylærbiolog Marianne N. Skov (KMA, Odense), molekylærbiolog Silje Vermedal Høgh (KMA, Odense), molekylærbiolog Marianne Lund (KMA, Aarhus), molekylærbiolog Ditte Lundsted (KMA, Aalborg), molekylærbiolog Irene Harder Tarpgaard (KMA, Aarhus), molekylærbiolog Rikke Lind Jørgensen (KMA, Hvidovre), molekylærbiolog Tina Vasehus Madsen (KMA, Slagelse), molekylærbiolog Martin Barfred Friis (KMA, Herlev) og molekylærbiolog Thomas Sundelin (KMA, Herlev).

2. Baggrund og definition af begreber

Når et laboratorie tager en ny analyse i brug, skal metoden forud for ibrugtagning enten verificeres eller valideres i forhold til det den skal bruges til. Ifølge ISO15189, skal laboratoriet vælge en metode, som er egnet til det der skal undersøges for og, foretrukne metoder er dem, der er beskrevet i brugsanvisningerne til *in vitro*-

medicinsk udstyr, metoder fra anerkendte lærebøger, videnskabelige tidsskrifter, internationale eller nationale standarder eller regulativer. Når laboratoriet vælger en metode, kan denne metode godt være valideret et andet sted f.eks. af det firma, der sælger analysen eller i et andet laboratorium. For at man kan forholde sig til om man skal lave en validering eller verificering skal man derfor vurdere om der allerede er lavet en validering og om den er tilstrækkelig. Vælger man en CE-IVD mærket metode er der oftest lavet en validering og derfor vil CE-IVD-mærkede metoder, bruges som synonym for allerede validerede metoder i resten af dette dokument. Metoder, der skal verificeres, er CE-IVD-mærkede analyser, som bruges uden ændringer i forhold til producentens/udgiverens anvisninger. ISO15189 stiller krav om, at analyser, der er udviklet af laboratoriet selv, eller CE-IVD-mærkede analyser, hvor en eller flere ændringer er foretaget i forhold til producentens/udgiverens anvisninger, skal valideres. Ændringer af CE-IVD-mærkede analyser eller en allerede implementeret analyse udløser, efter arbejdsgruppens vurdering, som oftest ikke en fuld validering af hele analysen, men kan oftest begrænses til en validering i forhold til den parameter, der er blevet ændret. Det er laboratoriets opgave at vurdere i hvilket omfang en sådan ændring påvirker analysen og i hvilket omfang analysen bør valideres. Eksempler på handlinger i forbindelse med ændringer af CE-IVD-mærkede analyser findes i bilag 2.

2.1 Acceptkrav

Laboratoriet skal, foruden at vurdere omfanget af en verifikation og en validering, definere de acceptkrav, som skal være opfyldt for, at analysen kan tages i brug rutinemæssigt. I de følgende afsnit angives MolNets anbefalinger til acceptkrav i skemaerne under hver enkelt valideringsparameter. Disse acceptkrav bør dog kun opfattes som vejledende, og der bør i hvert enkelt tilfælde foretages en konkret vurdering af de opstillede acceptkrav. Når acceptkrav defineres, bør der ud over metodemæssige krav også indgå en vurdering af om der er kliniske krav, der skal inkluderes.

2.2 Verifikation

Ved en verifikation skal laboratoriet gennem eksperimentelle observationer sikre, at laboratoriet er i stand til at udføre analysen i henhold til producentens specifikationer, jf. ISO15189. Det bør vurderes om producentens specifikationer lever op til de kliniske krav, der er til analysen. Skal metoden, der ønskes verificeret, erstatte en allerede eksisterende metode eller skal metoden bruges parallelt med en eksisterende metode, skal der desuden laves en metodesammenligning (se senere afsnit).

2.3 Validering

Ved en validering skal laboratoriet gennem eksperimentelle observationer bekræfte, at analysen lever op til de kvalitetskrav, der er stillet af laboratoriet. Under valideringen skal analysens ydeevne, jf. ISO15189 vurderes ud fra målekorrekthed, præcision, analytisk specificitet, analytisk sensitivitet, måleusikkerhed, måleinterval samt diagnostisk specificitet og diagnostisk sensitivitet. Skal metoden, der ønskes valideret, erstatte en allerede eksisterende metode eller skal metoden bruges parallelt med en eksisterende metode, skal der desuden laves en metodesammenligning (se senere afsnit).

2.4 Kvalitative analyser

En metode, hvor svaret til rekvirenten f.eks. angives som positivt/negativt eller påvist/ikke påvist. En kvalitativ analyse kan have kvantitative elementer, som f.eks. real-time PCR, hvor der aflæses en Ct-værdi og hvor der kan være en sammenhæng mellem mængden af agens i prøven og Ct-værdien for prøven. Efter MolNets mening regnes en sådan analyse for kvalitativ, og valideres/verificeres som sådan, når det endelige svar til rekvirenten gives kvalitativt.

2.5 Kvantitative analyser

En metode hvor svaret til rekvirenten angives med en koncentration (f.eks. IU/ml, CFU/ml eller kopier/ml). Et eksempel på en kvantitativ analyse er en real-time PCR-analyse, hvor svaret inkluderer en koncentrationsbestemmelse af en agens.

2.6 Referencemetoder

En metode, der har en lille estimeret usikkerhed på resultatet i forhold til den intenderede anvendelse. Usikkerheden er bestemt ud fra anvendelse af internationalt/nationalt anerkendt referencemateriale [2,3].

Referencemetoder anvendes typisk som sammenligningsgrundlag i forbindelse med validering af metoder [4]. Oftest er referencemetoder internationalt eller nationalt accepterede metoder, dog findes der inden for det klinisk mikrobiologiske område meget få af sådanne metoder.

2.7 Referencemateriale

Dette kan indenfor det klinisk mikrobiologiske område både være kvalitativt og kvantitativt. Materialet er tilstrækkeligt homogent og stabilt mht. de ønskede egenskaber i forhold til anvendelsen. Kvalitativt referencemateriale har et kendt indhold af en bestemt eller flere bestemte mikroorganismer. For kvantitativt referencemateriale vil koncentrationen også være kendt [4,5].

Nogle steder anvendes betegnelsen certificeret referencemateriale (CRM) for referencemateriale, hvor til der er knyttet en sporbar dokumentation (certifikat) for så vel indhold som evt. koncentration autoriseret af relevant myndighed eller organisation [5].

3 Specifikke krav til verifikation/validering indenfor amplifikationsbaseret diagnostik i klinisk mikrobiologi

I de følgende afsnit gennemgås de parametre der som hovedregel er nødvendige for at kunne vurdere analysens ydeevne. I gennemgangen er der fokus på hvordan parametrene bestemmes og hvordan de opnåede resultater anvendes og tolkes.

3.1 Målekorrekthed

Målekorrekthed beskriver en analyses evne til at give den sande værdi. Dette undersøges ved:

- At anvende accepteret referencemateriale med kendt indhold/værdi/koncentration som prøvemateriale eller sammenligne med resultater opnået ved anvendelse af accepteret referencemetode [6].
- Udføre analysen med mindst mulig variation i forhold, der kan påvirke analysen, f.eks. dag-til-dag variation, variation som følge af skift i bioanalytiker osv. Korrektheden kan også estimeres ved at udføre genfindingsforsøg [6].

Målekorrekthed beskriver analysens systematiske fejl og en analyse med en god målekorrekthed er derfor kun behæftet med en lille systematisk fejl.

Målekorrekthed er i princippet en ikke-numerisk størrelse, men der eksisterer dog en vis konsensus indenfor laboratorieverden om, at man (for kvantitative analyser) kan udtrykke målekorrekthed numerisk med regnestørrelsen bias [7, 8].

For kvantitative analyser, beregnes bias som forskellen mellem middelværdien af et stort antal målinger på den samme prøve med kendt værdi, og den sande værdi for det accepterede referencemateriale [for beregning af middelværdi, bias og standardafvigelse se ref. 6]. Hvis der er behov for at teste flere forskellige patogener samtidigt, kan referencemateriale for hver af disse kombineres, så længe man kan beregne koncentrationen af de enkelte patogener i poolen.

For en kvalitativ analyse giver målekorrekthed oftest ikke mening at bestemme. Dette gælder også for mange kvantitative metoder, der besvares kvalitativt, f.eks. real-time PCR-analyser, der besvares med positiv/negativ. Det er dog op til en vurdering i de enkelte tilfælde om målekorrekthed skal bestemmes som en del af verifikations- eller valideringsarbejdet.

Uanset om resultaterne kommer fra accepteret referencemateriale eller accepteret referencemetode kan man i praksis undersøge målekorrektheden ved at foretage følgende analyser [9 og 10] (se bilag 1 og tabel 1).

Tabel 1: Forsøgsoversigt for bestemmelse af målekorrekthed

CE-IVD-mærkede (verifikation) ¹	In house (validering)	Udtrykkes vha.	Acceptkrav
Der måles på prøvemateriale ² i mindst to forskellige koncentrationer ³ i minimum 6 replikater af hver.	Der måles på prøvemateriale ² i mindst to forskellige koncentrationer ³ i 10-15 replikater af hver.	Absolut værdi: $\bar{x} - x_0$ Fraktion eller procent: $\frac{(\bar{x} - x_0)}{x_0} \cdot 100\%$ Størrelse på genfindning: $\left(\frac{\bar{x}}{x_0}\right) \cdot 100\%$ \bar{x} : gennemsnit af de målte værdier. x_0 : den sande værdi	Der benyttes en t-test, one sample, til at bedømme om gennemsnittet af målinger på certificeret referencemateriale (CRM) er signifikant forskellig fra den sande værdi af CRM. Er gennemsnittet signifikant forskelligt fra den sande værdi, bør fremtidige prøveresultater korrigeres for bias ⁴ .

¹: Det bør i ethvert tilfælde vurderes, hvor stor en del af analysens arbejdsflow, der er dækket af CE-IVD-mærket, og om der er større eller mindre dele, der bør foretages som validering.

²: Prøvematerialet skal være materiale med kendt sand værdi. I princippet skal bestemmelsen af målekorrekthed foretages for alle prøvematerialer, der ønskes undersøgt med analysen, men ringe udvalg af referencemateriale, eller andet prøvemateriale med en kendt sand værdi, kan gøre dette svært. Hvis det ikke er muligt at fremskaffe prøvemateriale med en kendt sand værdi, kan man anvende prøver tilsat en kendt mængde syntetiske oligoer eller forsøge at indhente positivt materiale med en kendt værdi hos andre laboratorier. I dette tilfælde bør man foretrække at få materiale fra allerede akkrediterede laboratorier. Se desuden afsnittet Enheder.

³: Når der i tabellen skrives, at der måles i mindst 2 koncentrationer af patogenet, betyder det, at de præcise koncentrationer i alle tilfælde skal vurderes ud fra en klinisk sammenhæng. Koncentrationerne kan f.eks. være lidt over detektionsgrænsen (f.eks. 1,5 – 3 gange LoD) og middel positiv. Der kan desuden være behov for måling ved flere koncentrationer f.eks. på baggrund af kliniske beslutningsgrænser.

⁴: En nøjagtig bestemmelse af bias forudsætter at bestemmelsen af analysens middelværdi (\bar{x}) ikke er behæftet med stor spredning.

3.2 Præcision

Præcision er et mål for, hvor god overensstemmelse, der er mellem værdier/resultater, opnået ved gentagne, uafhængige målinger på en prøve.

Præcision siger således noget om analysens tilfældige fejl. En analyse med en god præcision er derfor kun behæftet med en lille tilfældig fejl.

Præcision er i princippet en ikke-numerisk størrelse, men der eksisterer dog en vis konsensus indenfor laboratorieverdenen om, at man (for kvantitative analyser) kan udtrykke præcision numerisk med størrelsen imprecision og udtrykkes som standardafvigelse (SD) eller relativ standardafvigelse (CV eller CV%) [11]. For en kvalitativ analyse udtrykkes præcision som bestemmelse af risikoen for et falsk negativt svar, bestemt under betingelser med maksimal variation [12].

Bestemmelsen af præcision kan udføres på mange niveauer (eksempelvis med variation mellem laboratorier, mellem maskiner eller mellem operatører) og det er derfor vigtigt, at man specificerer i verifikations-/valideringsrapporten præcis hvad man har varieret når man laver sin undersøgelse. Hvis man ikke har behov for at bestemme en specifik præcision, kan man vælge at bestemme præcisionen ved inkludering af al relevant variation (som f.eks. dag, operatør, lotnumre, apparatur, osv.) Dette kaldes som oftest den intermediære præcision. I nærværende tekst er det sidstnævnte, der er beskrevet.

Bestemmelse af præcision kræver i princippet ikke anvendelse af accepteret referencemateriale, da formålet med undersøgelsen er at få bestemt den tilfældige variation (og altså ikke om værdien er korrekt eller ej). Man bliver naturligvis nødt til at have en idé om prøvematerialets koncentration/værdi, men i princippet behøver man ikke kende prøvematerialets *præcise* koncentration/værdi for, at man kan anvende det til bestemmelse af præcisionen.

I praksis bestemmes præcision ved at analysere følgende [2, 9 og 10] (se bilag 1 og tabel 2).

Tabel 2: Forsøgsoversigt for bestemmelse af præcision

CE-IVD-mærkede (verifikation)¹		In house (validering)		Udtrykkes vha.	Acceptkrav⁴
Kvalitativ	Kvantitativ	Kvalitativ	Kvantitativ		
6 datamålinger ² i min. 2 koncentrationer ³ over tid, der sikrer relevant variation i personale, apparatur, reagenser m.m.	6 datamålinger ² i min. 2 koncentrationer ³ over tid, der sikrer relevant variation i personale, apparatur, reagenser m.m.	10 datamålinger ² i min. 2 koncentrationer over tid, der sikrer relevant variation i personale, apparatur, reagenser m.m.	15 datamålinger ² i min. 2 koncentrationer over tid, der sikrer relevant variation i personale, apparatur, reagenser m.m.	<p>Kvantitative: Standardafvigelse (SD) eller relativ standardafvigelse (CV eller CV%)</p> <p>Kvalitative: % Antal agreement resultater/totale antal resultater.</p>	<p>Kvantitative: Der testes for om der er forskell i spredningen mellem grupper med F-test (to grupper) eller ANOVA (mere end to grupper)</p> <p>Impræcision omkr. middelkoncentration ikke ≥15% CV (og ikke ≥20% CV omkr. detektionsgrænsen) [9].</p> <p>Kvalitative: Eksempelvis 90% overensstemmelse.</p>

¹: Der bør i ethvert tilfælde vurderes hvor stor en del af analysens arbejdsflow, der er dækket af CE-IVD-mærket, og om der er større eller mindre dele der bør foretages som validering.

²: Datamålinger er det samlede antal målinger ved den givne koncentration. Man bør i forsøgsdesignet sørge for at have flest replikater, der hvor man forventer størst mulig variation. 15 datamålinger kan f.eks. fordeles med 5 replikater målt på 3 dage eller 3 replikater målt på 5 dage. Forventer man at have stor dag-til-dag variation vil det derfor give mening at måle på 3 replikater hver dag i 5 dage. I princippet skal bestemmelsen af præcision foretages for alle prøvematerialer, der ønskes undersøgt med analysen, men af praktiske hensyn kan præcisionsbestemmelsen foretages på det prøvemateriale, hvor man har den største variation, hvis man kun ønsker at bestemme den størst mulige variation.

³: Når der i tabellen skrives, at der måles i mindst 2 koncentrationer af agens, betyder det, at de præcise koncentrationer i alle tilfælde skal vurderes ud fra en klinisk sammenhæng. Koncentrationerne kan f.eks. være lidt over detektionsgrænsen (f.eks. 1,5 – 3 gange LoD) og middel positiv. Der kan desuden være behov for måling ved flere koncentrationer f.eks. på baggrund af kliniske beslutningsgrænser. I nogle tilfælde kendes den præcise koncentration af prøvematerialet ikke og i disse tilfælde analyseres to forskellige fortyndinger af prøvematerialet.

⁴: Disse er kun vejledende. Ved fastsættelse bør man altid vurdere og sammenholde acceptkrav med den kliniske betydning af resultatet – og man kan således godt i visse situationer opsætte mindre restriktive krav.

3.3 Robusthed

Robusthed er et mål for, hvor følsom en analyse er over for mindre ændringer af ydre faktorer f.eks. i miljøet eller i udførelsen af analysen. Hvis resultaterne fra en analyse ikke påvirkes af sådanne ændringer, siges analysen at være robust. Nogle af disse relevante ydre faktorer vil være undersøgt i forbindelse med bestemmelse af analysens præcision, men hvis man ikke har kunnet variere alle de relevante parametre, bør man udføre en særskilt bestemmelse af analysens robusthed. Er analysen CE-IVD-mærket vil der i nogle tilfælde være parametre, som allerede er undersøgt af producenten under dennes validering.

Når man vil bestemme en analyses robusthed, skal man overveje, hvilke ændringer det vil give mening at undersøge. Dette kunne f.eks. være at undersøge, hvordan mindre ændringer i temperatur eller luftfugtighed i laboratoriet påvirker analysens resultater. Bruges der flere forskellige instrumenter i laboratoriet, f.eks. to forskellige modeller af PCR-maskiner, vil dette også være relevant at teste (hvis det ikke allerede er medtaget i bestemmelsen af præcisionen). I andre tilfælde vil det være relevant at se på om pipetteringsfejl, forskel mellem reagenslot, holdbarhed af reagenser eller andre faktorer påvirker analysen [13, 14, 15].

Når man undersøger en analyses robusthed, kan man ændre en faktor ad gangen og sammenligne mean og udføre t-test. Undersøgelserne udføres f.eks. med et passende antal gentagelser af to relevante koncentrationer. Har man mange faktorer, der skal undersøges, vil det ofte ikke være praktisk muligt at undersøge dem en ad gangen og man kan i disse tilfælde bruge en fractional factorial design approach, som f.eks. Plackett-Burman, som tillader undersøgelse af op til syv parametre på en gang [16].

I nogle tilfælde vil man ikke kunne lave en grundig undersøgelse af en metodes robusthed inden for den tidsramme der er sat af til et valideringsstudie. Man vil i disse tilfælde være nødt til at udføre disse undersøgelser efter valideringsstudiet er afsluttet og f.eks. dokumentere dette i et tillæg til valideringsrapporten.

3.4 Målenøjagtighed

Målenøjagtighed beskriver det fælles bidrag fra præcision og målekorrekthed [7, 17, 18]. Da disse to størrelser allerede er beskrevet andetsteds, henvises til disse for nærmere beskrivelse. Ydermere indgår målenøjagtighed i den samlede vurdering af måleusikkerhed med begge delelementer (målekorrekthed/bias og præcision).

3.5 Måleusikkerhed

Det samlede bidrag af usikkerhed og fejl forbundet med præanalytiske, analytiske og postanalytiske forhold betegnes måleusikkerhed. I ISO15189:2023 er bestemmelse af måleusikkerhed et krav. Hvis det ikke er muligt at bestemme måleusikkerheden eller det ikke er relevant, skal det dokumenteres hvorfor det er tilfældet.

I praksis beregnes måleusikkerheden u for kvantitative analyser ud fra formlen [19, 20]:

$$u = \sqrt{(S_m^2 + S_p^2 + \dots S_n^2)}$$

Hvor S_m og S_p er standardafvigelsen for henholdsvis målekorrekthed og præcision (se disse afsnit). Bemærk, at der kan være andre kvantificerbare bidrag til måleusikkerheden som er specifikke for den enkelte analyse (angivet som S_n^2).

Den ekspanderede (udvidede) måleusikkerhed U beregnes efterfølgende for et ønsket konfidensinterval ud fra formlen:

$$U = u \times k$$

Hvor u er måleusikkerheden og k er dækningsfaktoren. Hvis det antages at måleresultaterne er normalfordelt, kan k sættes til 2, hvilket svarer til et konfidensinterval på 95%.

Da målekorrekthed og præcision bestemmes ved flere koncentrationer, udregnes måleusikkerheden også for forskellige koncentrationsniveauer. Måleusikkerheden udtrykkes ved SD, CV eller CV% i hvert af disse niveauer [6].

Enkelte bidrag til måleusikkerheden er svært-/ikke-kvantificerbare (se bilag 3) og derfor skal disse vurderes uafhængigt af de kvantificerbare bidrag. Det skal dog stadig fremgå af det samlede usikkerhedsbudget, at disse er vurderet og det skal dokumenteres, at man har forholdt sig bevidst til dem, når man estimerer måleusikkerheden. De ikke-kvantificerbare bidrag skal overvejes og dokumenteres i validerings- eller verifikationsforløbet.

3.6 Analytisk sensitivitet

Den analytiske sensitivitet angives som et assays evne til at detektere små mængder af en agens, f.eks. DNA eller RNA. Denne sensitivitet angives som en koncentration med passende enhed (se afsnit 4.1 Enheder). Den analytiske sensitivitet bliver herved lig med detektionsgrænsen for et assay [9, 21, 22].

3.7 Detektionsgrænse

Detektionsgrænsen er den laveste koncentration af en agens, hvor man med en given sandsynlighed kan skelne denne fra en sand negativ prøve. Detektionsgrænsen benævnes ofte Limit of Detection (LoD). I mange sammenhænge defineres detektionsgrænsen som den koncentration, hvor man med 95% sikkerhed kan detektere agens. For valg af enheder, se afsnit 4.1 Enheder. For kommercielle kits, der er CE-IVD-mærkede, er det oftest ikke nødvendigt at bestemme detektionsgrænsen, da denne er bestemt af producenten. For analyser udviklet i laboratoriet og modificerede kommercielle analyser, bestemmes detektionsgrænsen som beskrevet i tabel 3 (se desuden bilag 1).

Tabel 3: Forsøgsoversigt for bestemmelse af detektionsgrænse

In house/modificerede CE-IVD-mærkede kits	Udtrykkes vha.	Acceptkrav
2-3 fortyndinger lige omkring detektionsgrænsen. Der køres 6-20 replikater. Antal replikater og fortyndingsfaktoren afhænger af hvor nøjagtig LoD skal bestemmes.	Antal positive af antal replikater.	95% af replikater skal være positive.

Nøjagtigheden af detektionsgrænsen bestemmes af antal replikater, samt hvilken fortyndingsfaktor man bruger. 6 replikater giver et groft estimat, mens 20 replikater er nødvendigt for et mere præcist estimat [23-25].

Hvis en detektionsgrænse ikke er relevant, f.eks. hvis man kører PCR på pladekulturer eller opformeret materiale (dvs. situationer hvor der altid er rigeligt med prøvemateriale), behøver man ikke serielle fortyndinger, men kan nøjes med at køre et passende antal replikater i en koncentration, der ligger et stykke over detektionsgrænsen.

I de tilfælde hvor der er en risiko for, at prøven bliver falsk negativ, som følge af en overloading af PCR-reaktionen, kan det være nødvendigt at bestemme den koncentration hvor hæmningen sker. Dette kan være tilfældet ved PCR på pladekulturer eller opformeret materiale.

Man kan selv beregne, hvor mange replikater og koncentrationer, der skal til for at få et tilfredsstillende interval for analysen med beregningsmetoden fra Quodata [26]. LoD_{95%} bliver en værdi med et konfidensinterval, der bliver smallere jo flere replikater man har. Quodata kan findes ved at følge nedenstående link:

<https://quodata.de/content/validation-qualitative-pcr-methods-single-laboratory/login>

3.8 Kvantificeringsgrænse

En analyses kvantificeringsgrænser bestemmes som den laveste og højeste koncentration af en agens, der kan bestemmes kvantitativt med en acceptabel præcision. Ofte omtales kvantificeringsgrænsen også som LoQ (Limit of Quantitation). For FDA eller CE-IVD-mærkede kommercielle kits er der oftest ikke yderligere behov for at bestemme kvantificeringsgrænserne, da disse er oplyst af producenten. For analyser udviklet af laboratoriet bestemmes kvantificeringsgrænserne som beskrevet i tabel 4 (se desuden bilag 1).

Tabel 4: Forsøgsoversigt for bestemmelse af kvantificeringsgrænse

In house/modificerede CE-IVD-mærkede kits	Udtrykkes vha	Acceptkrav
6-8 koncentrationer i triplikater, som dækker og rækker lige ud over det lineære område i PCR-analysen.	LoQ: Variation for replikater i de koncentrationer, hvor alle replikater er positive	LoQ: CV% skal være mindre eller lig med en given værdi (25-35%) ¹ .

¹Der er ikke nogen alment vedtagne acceptkrav til CV%, mange angiver 25-35% [20, 21], men værdien kan også afhænge af koncentrationen af prøven.

Vær opmærksom på, at der skal være en lineær sammenhæng mellem det detekterede signal og koncentrationen i kvantificeringsområdet.

3.9 Analytisk specificitet

Den analytiske specificitet er et assays evne til kun at detektere den nukleinsyresekvens, der ønskes fundet, og ikke sekvenser fra andre organismer i en prøve. Inden for den kliniske mikrobiologi er der oftest tale om krydsreaktivitet til nært beslægtede mikroorganismers RNA/DNA. For at afgøre om mikroorganismer giver anledning til krydsreaktion bør man overveje at teste relevante mikroorganismer med lignende genomisk struktur, der kunne findes i prøven (f.eks. fundet ved søgning i GenBank), nært beslægtede mikroorganismer og normalflora. Desuden skal mikroorganismer, der kan forårsage lignende symptomer og relevante co-infektioner testes. Specificiteten kan desuden påvirkes af andre indholdsstoffer i prøven [21, 22]. Det kan være svært at undersøge påvirkningen fra alle indholdsstoffer (og potentielle indholdsstoffer) for et assay ved en verifikation/validering og det er derfor vigtigt, at assayet er designet så der er en intern kontrol med i hver prøve [9, 27]. Uden den interne kontrol er det ikke muligt at vurdere om en negativ prøve reelt er negativ.

Når man undersøger den analytiske specificitet, bør man ligeledes undersøge et antal negative prøver, ofte mellem 3 og 10, for at vise, at der ikke er krydsreaktivitet til prøvematerialet eller, at der ikke sker kontaminering under analysen. Har man mistanke om, at et assay, vil kunne give uspecifikke amplifikationer, vil det dog være hensigtsmæssigt at undersøge et større antal negative prøver. I meget lukkede systemer, f.eks. hvor prøvematerialet tilsættes direkte til analysekassetten, kan der evt. være behov for at undersøge et mindre antal end ved meget åbne systemer. Når man verificerer/validerer analysepaneler, kan prøver positive for et patogen ofte bruges som negative prøver for de andre patogener i panelet.

3.10 Diagnostisk sensitivitet og specificitet

Diagnostisk sensitivitet og specificitet er to begreber, som ikke er helt klart definerede. Afhængig af det aktuelle assay kan diagnostisk sensitivitet beskrive assayets evne til at finde de patienter, der rent faktisk er syge (dvs. dem der har symptomer), andre gange dem der er inficerede (men ikke nødvendigvis har symptomer), mens det også kan beskrive evnen til at finde alle de prøver hvor patogenet er tilstede i prøven. Dette kaldes i det følgende "sandt positive patienter". Diagnostisk specificitet kan på samme måde beskrive assayets evne til at finde raske patienter/ikke-inficerede og prøver uden patogen. Dette kaldes efterfølgende "sandt negative patienter". I ref. 28 er der en mere grundig gennemgang af disse begreber med eksempler på beregninger osv.

Diagnostisk sensitivitet er et mål for en metodes evne til at identificere sandt positive patienter. Den diagnostiske sensitivitet angiver forholdet mellem antallet af sandt positive patienter og summen af sandt positive og falsk negative patienter ved en undersøgelse.

Diagnostisk specificitet er et mål for en metodes evne til at identificere sandt negative patienter. Den diagnostiske specificitet angiver forholdet mellem antallet af sandt negative patienter og summen af sandt negative og falsk positive patienter ved en undersøgelse.

Det er i praksis svært at bestemme diagnostisk sensitivitet og specificitet korrekt, da dette vil kræve et større patientstudie for at få et tilstrækkeligt stort antal af sandt positive og negative patienter.

3.11 Måleinterval

Måleintervallet beskriver normalt det område, der ligger mellem analysens øvre og nedre detektionsgrænse. I enkelte tilfælde kan man med fordel angive et måleinterval, der ligger inden for de to detektionsgrænser, for at afspejle en klinisk relevans. Dette ses eksempelvis ved agens, der i en lav koncentration kan detekteres, men som ikke har en klinisk betydning for patienten.

4 Øvrige relevante parametre

4.1 Enheder

Efter MolNets mening er det for kvantitativ virusbestemmelse, hvor det er muligt, bedst at benytte International Units (IU). Hvis forskellige laboratorier benytter IU kalibreret mod samme referencestandard f.eks. WHO, er det muligt at sammenligne resultater på tværs af laboratorier. Hvad man ellers vælger som enhed afhænger af, hvad der er muligt for laboratoriet, mest fordelagtigt eller hvad man traditionelt bruger af enhed indenfor kvantificering af det pågældende patogen f.eks:

Virus:

- IU/ml: Sammenlignelig på kryds af laboratorier
- Antal kopier pr. enhed, f.eks. kopier/ml, kopier/celle, kopier/g væv
- Mængdeangivelse pr. volumenhed f.eks. ng/ μ l
- Genomækvivalenter
- pfu/ml

Bakterier:

- Antal kopier pr. enhed f.eks. kopier/ml, kopier/celle, kopier/g væv
- Mængdeangivelse pr. volumenhed f.eks. ng/ μ l
- Genomækvivalenter
- cfu/ml

Parasitter og svampe:

- Antal kopier pr. enhed f.eks. kopier/ml, kopier/celle, kopier/g væv
- Mængdeangivelse pr. volumenhed f.eks. ng/ μ l
- Genomækvivalenter

4.2 Validering/verifikation af apparatur og reagenser

Apparaturer og reagenser er ofte anskaffet for at blive anvendt direkte i forbindelse med en/flere undersøgelser. Valideringen/verifikation af apparatet/reagenset vil derfor indgå som en naturlig del i validerings-/verifikationsrapporten for den pågældende undersøgelse. Dette vil oftest betyde, at der ikke er behov for at udføre selvstændige undersøgelser, men blot henviser til den pågældende validerings-/verifikationsrapport.

Anskaffer man sig nyt apparatur af en anden slags eller nyt reagens i forhold til det, der oprindeligt blev anvendt i forbindelse med validerings-/verifikationsrapporten, så skal man i princippet udføre en ny validering/verifikation. MolNets arbejdsgruppe har

dog formuleret nogle undtagelser for denne mere generelle regel, som kan findes i afsnit 4.5 Krav til tillægsrapporter.

Anskaffer man sig nyt apparatur af samme slags, som det der oprindeligt blev anvendt i forbindelse med valideringen/verifikationen, så kan den pågældende validering/verifikation overføres til apparaturet. Man skal dog sikre sig, at det nye apparatur fungerer efter hensigten. Dette kan f.eks. undersøges (og dokumenteres) ved at køre et mindre antal positive og negative kontroller, som skal give det forventede resultat. Metoden til at sikre sig, at det nye apparatur fungerer efter hensigten, afhænger af det pågældende apparatur og hvilken klinisk kontekst det skal anvendes i.

Hvis man har flere apparaturer af samme slags, kan der være behov for at dokumentere, at de enkelte apparaturer har samme ydeevne. Dette kan gøres ved at køre en række prøver parallelt på de respektive apparaturer.

I visse tilfælde kan man med fordel anvende retrospektive data til at dokumentere dette (f.eks. foretage udtræk af data for interne kontroller fra de respektive apparaturer). Dette kan f.eks. være relevant, hvis man har et apparat, man kun har anvendt til forskning og som nu skal anvendes i diagnostikken.

Hvis man konstaterer, at der er stor forskel på ydeevne mellem de enkelte apparaturer, vil der være behov for at udføre en mere omfattende undersøgelse. Er den konstaterede forskel større end de opstillede acceptkrav vil der være behov for at reklamere over for producenten.

4.3 Metodesammenligning og information til rekvirenter

Ved omlægning fra én analysemetode til en anden bør metodesammenligning i flg. ISO15189 være en del af verifikationen/valideringen. Heri ligger implicit, at man ikke behøver udføre en metodesammenligning, hvis man indfører en helt ny undersøgelse, som man ikke har udført tidligere. Der er dog flere andre situationer, hvor det vil være nødvendigt at overveje, om der skal udføres en metodesammenligning. Disse situationer kan f.eks. være når en analyse udføres samtidigt på flere forskellige analyseplatforme eller når der bruges flere forskellige kits til detektion af samme agens på samme platform.

Formålet med en metodesammenligning er således at vurdere, om resultaterne fra den nye metode adskiller sig væsentlig fra resultaterne fra den tidligere anvendte metode. I tilfælde hvor resultaterne adskiller sig væsentligt fra den tidligere anvendte metode, skal det overvejes om man skal informere sine rekvirenter om ændringen i metoden (eks. kunne være; ny kvantitativ CMV-undersøgelse der anvender IU/ml i stedet for kopier/ml, en ny metode der forskubber de kvantitative resultater med en faktor 10, en ny metode der har en lavere detektionsgrænse end den tidligere el. lign.). I andre tilfælde kan det være mere uklart om der er behov for information til rekvirenterne (f.eks. hvis man begynder at give hurtigere svar), men det bør altid overvejes.

Mange gange vil man have udført denne metodesammenligning i forbindelse med, at man har undersøgt og vurderet nye metoder i jagten på en bedre metode end den tidligere anvendte.

Faktorer man ønsker at få svar på i denne sammenhæng kunne være:

- Forskel i sensitivitet og specificitet mellem de to metoder
- Forskel i detektionsgrænse
- Forskel i målekorrekthed og/eller præcision
- Forskel i måle- og/eller kvantificeringsinterval
- Forskel i graden af hæmning

Mange af disse spørgsmål vil ikke kræve ekstra undersøgelser, da data allerede vil være tilgængelige fra den tidligere metodes validerings-/verifikationsrapport samt fra den nye metodes validerings-/verifikationsrapport.

Det er ikke muligt præcist at beskrive, hvad der vil være relevant i enhver metodesammenligning, men nogle af de spørgsmål, som kunne tænkes at kræve ekstra undersøgelser af prøver, kunne være [6]:

- Er der resultater, der afviger ekstremt meget (outliers)? Bør disse ekskluderes fra beregningerne?
- Er der en ikke-lineær sammenhæng mellem resultaterne fra de to metoder?
- Er der ikke sammenhæng mellem resultaterne fra de to metoder?
- Hvis der er en forskel mellem resultaterne fra de to metoder, overskrider forskellen så det acceptable?

Ovenstående fire punkter giver oftest kun mening at overveje for kvantitative analyser, men de kan være relevante for enkelte kvalitative eller semi-kvantitative undersøgelser. Til undersøgelse af dette, vil der være behov for at undersøge en række prøver med forskellig koncentration. Antallet af undersøgte prøver bør sikre, at der undersøges prøver, der dækker hele det relevante måleinterval, og ofte vil dette kunne opnås med ca. 20 prøver pr. target. Der kan anvendes spikede og/eller poolede prøver. Ved den statistiske behandling af data fra metodesammenligningen bør der ikke bruges parret t-test, da denne ikke giver oplysninger om outliers, systematiske fejl osv. I stedet bør korrelationen mellem analyserne undersøges og der bør foretages lineær eller Deming regressionsanalyse. Et Bland-Altman plot (differensplot) kan desuden være nyttigt til at vise om der er en systematisk forskel i målingerne fra de to metoder. Desuden bør der foretages en visuel inspektion af residualplot [6].

Det vurderes ikke muligt at fastsætte generelle acceptkrav for hvorledes den nye metode skal yde i forhold til den tidligere anvendte, da acceptkravene vil afhænge af den tidligere metodes karakter, årsag til metodeskiftet og den kliniske betydning af resultaterne. Er den tidligere anvendte metode f.eks. en dyrkningsbaseret metode er dette væsentligt forskelligt fra en situation, hvor den tidligere metode er en PCR baseret metode.

4.4 Granskning af verifikation-/valideringsrapporter

Alle verifikations-/valideringsrapporter gennemgås som hovedregel i henhold til afdelingens gældende regler. Granskningsfrekvensen bør dog fastlægges ud fra en risikovurdering, der tager højde for f.eks. frekvensen af ændringer i mikroorganismens arvemateriale.

Såfremt acceptkrav i verifikations- eller valideringsrapporten ændres, skal det vurderes om analysemetoden fortsat lever op til de ændrede kvalitetskrav, på de punkter som ændringen har indflydelse på.

Ved granskning af rapporten er det blandt andet nedenstående man skal kigge på:

CE-IVD-mærkede kit:

I den udstrækning det er muligt, bør der indhentes oplysninger fra producenten om, hvorvidt alle nuværende kendte varianter, med klinisk relevans, er inkluderet i analysemetoden.

In-house assays:

Der foretages en vurdering af, hvorvidt analysemetodens primer-/probesequenser inkluderer alle nuværende kendte varianter med klinisk relevans.

Data der kan inkluderes i rapporten i forbindelse med granskning:

- Data fra eksterne kvalitetskontrol-paneler
- Historiske data
- Data fra prøver sendt til overvågning på SSI

Såfremt det vurderes, at analysemetoden fortsat lever op til kvalitetskravene kan verifikations-/valideringsrapporten godkendes uden, at der skal foretages yderligere. Det skal dokumenteres at granskning er gennemført samt, at rapporten er godkendt.

4.5 Krav til tillægsrapporter

Nogle gange bliver man nødt til at ændre i allerede validerede/verificerede undersøgelser.

Eksempler på ændringer kan være:

- Nyt udstyr (f.eks. ekstraktion eller PCR)
- Nyt PCR-program
- Ny procedure for prøvehåndtering (prøveforberedelse)
- Justering af prøvevolumen, der anvendes til analysen
- Justering af reagensvolumen, der anvendes til analysen
- Ny procedure for transport/opbevaring af prøver
- Justering af detektionsgrænser
- Skift/re-design af reagenser (f.eks. master mix/primere/prober)
- Skift i væsentlige utensilier der bruges i analyseprocessen

Ifølge ISO15189 skal der udarbejdes en ny validering/verifikation i disse tilfælde. Hvis det kun drejer sig om mindre ændringer, vurderer MolNet dog, at udarbejdelse af en tillægsrapport vil imødekomme formålet med kravet i ISO15189.

Hvis undersøgelsen er akkrediteret, er ovennævnte naturligvis noget, der skal aftales med DANAK, ligesom ændringerne først kan træde i kraft, når tillægsrapport samt øvrige relevante dokumenter (f.eks. opdateret validerings-/ verifikationsrapport) er godkendt af DANAK.

Det skal fremgå tydeligt af validerings-/verifikationsrapporten, hvilke ændringer, der er foretaget og præcis hvilke trin/processer tillægsrapporten dækker.

Man skal i alle tilfælde vurdere, om der er behov for at foretage en egentlig metodesammenligning (dvs. sammenligning af resultater opnået før og efter implementering af ændringen) i forbindelse med tillægsrapporten. For uddybende information om metodesammenligning samt evt. behov for orientering af rekvirenter se tidligere afsnit 4.3 Metodesammenligning og information til rekvirenter.

Selvom der udarbejdes en tillægsrapport og ikke en fuld validering/verifikation, skal der stadigvæk opstilles acceptkrav/kvalitetskrav for de ændringer, der implementeres.

Omfang og fokus for tillægsrapporten vil afhænge af den aktuelle ændring. Hvis det skønnes relevant, kan man supplere med f.eks. målekorrekthed, detektionsgrænse, kvantificeringsgrænse, måleinterval og/eller præcision.

5 Referencer

- 1) Dansk Selskab for Klinisk Mikrobiologi (2017) Anbefaling vedrørende implementering og anvendelse af Point-of-Care teknologi til diagnostik af infektionssygdomme. <https://dskm.dk/wp-content/uploads/2016/08/POC-Rapport-fra-DSKMs-Udvalg.pdf>
- 2) Clark R. B, Lewinski M. A., Loeffelholz M. J. & Tibbetts R. B. (2009) Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory. In Sharp S. E. (Ed.), *Cumitech 31A*. Washington DC: American Society of Microbiology Press.
- 3) IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook
- 4) International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), 3rd edition, 2008 version with minor corrections. Pkt. 2. 7 (http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_200_2012.pdf)
- 5) International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), 3rd edition, 2008 version with minor corrections. Pkt. 5.13 og 5.14 (http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_200_2012.pdf)
- 6) Sindt C. & Jørgensen H. L. (2017) Statistiske metoder i biomedicin. Norderstedt: Books on demand
- 7) ISO 5725-1:1994 - Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions.
- 8) ISO 3534-2:2006. Statistics - Vocabulary and symbols - Part 2: Applied statistics.
- 9) Burd E. M., (2010) Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Disease. *Clinical Microbiology Reviews* 23(3) 550-576. doi:10.1128/CMR.00074-09
- 10) Espy M. J., Uhl J. R., Sloan L. M., Buckwalter S. P., Jones M. F., Vetter E. A., Yao J. D. C., Wengenack N. L., Rosenblatt J. E., Cockerill III F.R. & Smith T.F. (2006) Real-time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews* 19(1) 165-256. doi:10.1128/CMR.19.1.165-256.2006
- 11) National Association of Testing Authorities Australia. Technical Note 17 – Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods, June 2012. (<http://www.demarcheiso17025.com/document/Guidelines%20for%20the%20validation%20and%20verification%20of%20quantitative%20and%20qualitative%20test%20methods.pdf>)
- 12) Anon, Slide 7 fra undervisning i Kap. 5.5 Undersøgelsesprocedurer. Valg, validering, verifikation. DANAK Grundkursus for assessorer DS/EN ISO 15189:2013. Afholdt 15-17 april 2015.

- 13) World Organisation for Animal Health. (2021) Chapter 1.1.2: Principles and Methods of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases I Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.
- 14) Broeders S., Huber I., Grohmann L., Berben G., Taverniers I., Mazzara M., Roosens N & Morisset D. et al. (2014) Guidelines for Validation of Qualitative Real-Time PCR Methods. *Trends in Food Science & Technology* 37 115-126.
- 15) U.S. Food and Drug Administration (2020) Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Nucleic Acid Sequence-Based Analyses of Food, Feed, Cosmetics and Veterinary Products. Edition 1.1
- 16) Statistical Manual of the AOAC, W. J. Youden og E. H. Steiner, 1975, AOAC, Arlington, VA, USA. ISBN 0-935584-15-3
- 17) Deldossi L. & Zappa D. (2009) ISO 5725 and GUM: comparison and comments. *Accreditation and Quality Assurance* 14(3) 159-166. <https://doi.org/10.1007/s00769-008-0478-3>.
- 18) International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), 3rd edition, 2008 version with minor corrections. Pkt. 2.13. JCGM 200:2012
- 19) Ellison S. L. R. & Williams A. (Eds.) Eurachem/CITAC Guide CG 4 Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 3rd Edition, 2012 (http://www.citac.cc/QUAM2012_P1.pdf)
- 20) Eurolab Technical report no. 1/2006, August 2006: Guide to the Evaluation of Measurement Uncertainty for Quantitative Test Results. (<https://www.isobudgets.com/pdf/uncertainty-guides/eurolab-technical-report-1-2006-guide-to-the-evaluation-of-measurement-uncertainty-for-quantitative-test-results.pdf>)
- 21) Saah A. J. & Hoover D. R. (1997) "Sensitivity" and "Specificity" Reconsidered: The Meaning of These Terms in Analytical and Diagnostic Settings. *Annals of Internal Medicine* 126(1) 91-94. doi: 10.7326/0003-4819-126-1-199701010-00026
- 22) Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J. & Wittwer C. T. (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55(4) 611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- 23) Kralik, P. & Ricchi, M. (2017) A basic guide to real time PCR microbial diagnostics: Definitions, parameters and everything. *Frontiers in Microbiology* 8 108. doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108.
- 24) Kubista, M. (2014) Prime Time for qPCR – Raising the Quality Bar. *Pharmaceutical Review* 19 (3) 63-67
- 25) Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögren, B., Linz, L. & Kubista, M. (2017) Methods to Determine Limit of Quantification in Quantitative Real-Time PCR (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification* 12 1-6. doi: 10.1016/j.bdq.2017.04.001

- 26) Uhlig S., Frost K., Colson B., Simon K., Mäde D., Reiting R., Gowik P. & Grohmann L. (2015) Validation of Qualitative PCR Methods on the Basis of Mathematical-Statistical Modelling of the Probability of Detection. *Accreditation and Quality Assurance* 20(2) 75-83. doi: 10.1007/s00769-015-1112-9
- 27) Sloan L. M. (2007) Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Verification, Validation, and Contamination Control. *Clinical Microbiology Newsletter* 29(12) 87-95. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2007.05.002
- 28) Klinisk Mikrobiologi & Infektionsmedicin. Høiby N. & Andersen Å. B., 2021, 5. udgave, FADL's forlag. ISBN 978-87-93810-09-9.

Bilag 1: Oversigt over nødvendige målepunkter i forbindelse med verifikation/validering

	CE/IVD-mærkede kit (verifikation)		In house (validering)	
	Kvalitativ	Kvantitativ	Kvalitativ	Kvantitativ
MÅLEKORREKTHED¹	Ikke relevant	6 datamålinger³ min. 2 relevante konc.	Ikke relevant	10-15 datamålinger³ min. 2 relevante konc.
PRÆCISION^{1,2}	6 datamålinger min. 2 relevante konc. over tid, der sikrer relevant variation i personale, apparatur, reagenser m.m.	6 datamålinger min. 2 relevante konc. over tid, der sikrer relevant variation i personale, apparatur, reagenser m.m.	10 datamålinger min. 2 relevante konc. over tid, der sikrer relevant variation i personale, apparatur, reagenser m.m.	15 datamålinger min. 2 relevante konc. over tid, der sikrer relevant variation i personale, apparatur, reagenser m.m.
DETEKTIONSGRÆNSE	Angives af producenten ⁴	Angives af producenten ⁴	6-20 datamålinger 2-3 konc. lige omkring detektionsgrænsen. Antal replikater afhænger af, hvor præcist man ønsker detektionsgrænsen bestemt.	6-20 datamålinger 2-3 konc. lige omkring detektionsgrænsen. Antal replikater afhænger af, hvor præcist man ønsker detektionsgrænsen bestemt.
KVANTIFICERINGS-GRÆNSE	Ikke relevant	Angives af producenten ⁴	Ikke relevant	3 datamålinger 6-8 konc. som dækker og rækker lige ud over det lineære område i PCR-analysen.
ANALYTISK SPECIFICITET	I hvert enkelt tilfælde skal det vurderes om der er behov for at teste prøver og hvor mange. Mikroorganismer det skal overvejes at teste inkluderer stammer/typer, som skal findes, og nært beslægtede mikroorganismer og normalflora, som ikke skal findes. Test i laboratoriet kan kombineres med <i>in silico</i> -analyse.			

¹Datamålinger er det samlede antal målinger ved den givne koncentration. Flere targets kan tilsættes samme prøve, hvis der køres multiplex.

²Man bør i forsøgsdesignet sørge for at have replikater, der hvor man forventer størst mulig variation. 15 datamålinger kan f.eks. fordeles med 5 replikater målt på 3 dage eller 3 replikater målt på 5 dage. Koncentrationer skal vælges ud fra bl.a. klinisk relevans. I princippet skal bestemmelsen af præcision foretages for alle prøvematerialer, der ønskes undersøgt med analysen, men af praktiske hensyn kan præcisionsbestemmelsen foretages på det prøvemateriale, hvor man har den største variation, hvis man kun ønsker at bestemme den størst mulige variation.

³Prøvematerialet skal være materiale med en kendt sand værdi.

⁴I nogle tilfælde kan det være ønskeligt at efterprøve producentens oplysninger. Der bør desuden altid foretages en vurdering af om de oplyste værdier opfylder de kliniske krav, der er til analysen.

Bilag 2: Forslag til håndtering af brud på CE-IVD-mærkning i forbindelse med en verifikation

Dette bilag er ment som en hjælp i tilfælde af, at man har brug for at bryde valideringen på CE-IVD-mærkede analysekit. For at gøre bilaget mere konkret er der taget udgangspunkt i eksempler fra arbejdsgruppens laboratorier. Disse eksempler er resumeret under de enkelte punkter. Der er valgt en opdeling af analyserne på følgende måde:

Gruppe A	Fuldautomatisk metode, f.eks. analyser på GeneXpert fra Cepheid og Panther fra Hologic
Gruppe B	PCR-kits uden oprensning, f.eks. DermaGenius fra Pathnostics og CMV og EBV fra Altona
Gruppe C	Metoder til ekstraktion af nukleinsyre, f.eks. QIASymphony DSP Virus/Pathogen kit fra Qiagen og MagNA Pure 96 DNA & Viral NA small volume Kit fra Roche.
Gruppe D	Primer-probemix, f.eks. Lightmix Modular fra TIB molbiol og DEC Primermix fra SSI Diagnostica

I dette bilag bruges følgende terminologi som kræver uddybning:

Fortyndingsrække

Sammenligning af den CE-IVD-mærkede metode/procedure/prøvemateriale mod den ikke-validerede metode/procedure/prøvemateriale. Der sammenlignes min. 3 målepunkter med høj, middel og lav koncentration målt i triplikat.

Analytisk sensitivitet

Ved den analytiske sensitivitet forstås den mindste mængde agens der med et 95% konfidensinterval kan detekteres. Den analytiske sensitivitet er derfor lig med LoD. For arbejdsgruppens anbefalinger mht. antal, der skal bruges til bestemmelse af LoD, henvises til tidligere afsnit i dette dokument.

Bilag 2: Liste over håndtering af brud på CE-mærkning i forbindelse med en verifikation, fortsat

Gruppe A			
Fuldautomatiske systemer			
Område	Ændring	Eksempel	Aktion
Prøver	Prøve- materiale der ikke er valideret.	BD MAX og GeneXpert (ifm. undersøgelse for norovirus/rotavirus, kighoste, atypisk pneumoni, influenza, enterovirus), hvor man undersøger prøvemateriale systemet ikke er valideret til. Norovirus/C. difficile som analyseres på fecalswab i stedet for fæces. MRSA-undersøgelse på GeneXpert, hvor 3 podninger fra samme patient pooler af sparehensyn.	<p>Prøvemateriale man sjældent modtager: Man undlader at verificere analysen og i stedet gøres opmærksom på denne begrænsning i forbindelse med afgivelse af svaret til rekvirenten (evt. i form af et stempel eller i information til afdelingens rekvirenter).</p>
			<p>Prøvemateriale man ofte modtager: Man bør udvide verifikation mhp. en sammenligning af de to typer af prøvemateriale, evt. holdt op imod tidligere anvendte påvisningsmetode. Overvej ligeledes om typen af det andet prøvemateriale gør det nødvendigt at undersøge for:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ændret analytisk sensitivitet. • Ændret oprensings-effektivitet. Gøres vha. fortyndingsrække. • Ændret PCR-effektivitet (f.eks. sfa. inhibering fra prøvematerialet). Gøres vha. fortyndingsrække. • Ændring i analytisk specificitet (hvis det er prøvemateriale fra samme lokalisation bliver problematikken om ændring af mikroflora mindre relevant). • Andre krav til transport, inkl. temp. og tid.
			<p>Isolat i stedet for patientprøve: Det skal sikres, at der ikke tilsættes et overskud af kolonimateriale, som kan ændre PCR-effektiviteten (hæmning).</p>
			<p>Poollet prøvemateriale i stedet for at undersøge disse enkeltvis: Man bør sikre sig, at fortyndingen ikke medfører, at koncentrationen af agens falder til under et klinisk acceptabelt niveau.</p>

Bilag 2: Liste over håndtering af brud på CE-mærkning i forbindelse med en verifikation, fortsat

Gruppe A, fortsat			
Fuldautomatiske systemer			
Område	Ændring	Eksempel	Aktion
Prøver	Transportmedie der ikke er valideret.	På Panther Fusion benyttes eSWAB i stedet for UTM til respiratoriske prøver.	Man bør analysere transportmedier for tilstedeværelse af positivt materiale i selve mediet. Det bør desuden undersøges, om medieskift betyder en ændring i oprensings-effektiviteten. Gøres vha. fortyndingsrække.
	Anden temp. ved transport.	Eks. fra BD MAX (ifm. undersøgelse for norovirus/rotavirus), hvor prøver af praktiske hensyn transporteres ved anden temp. end de er valideret til (i eks. transporteres alt dog på køl).	En litteraturgennemgang kan bruges til at belyse prøvematerialets holdbarhed ved opbevaring under forskellige forhold (f.eks. temperatur, luftfugtighed, tid etc.). <ul style="list-style-type: none"> • Sammenligning af analyseresultater for prøve transporteret ved henholdsvis valideret temperatur og ikke-valideret temperatur. Undersøges på prøvemateriale (evt. spikede prøver) med en koncentration af agens lidt over detektionsgrænsen. • I enkeltstående tilfælde kan denne type prøve påsættes stempel om, at materialet ikke er transporteret korrekt, hvorfor svaret bør tolkes med forsigtighed. ISO15189:2013 pkt. 5.4.6.c/ISO15189:2023 pkt. 7.2.6.2 giver mulighed for dette.
	Holdbarhed af prøver efter prøvetagning inden analyse.	Eks. fra BD MAX og GeneXpert (undersøgelse for norovirus/rotavirus, C. difficile), hvor nogle prøver har "forkert" prøvetagningsdato, da patienter kan få rekvisition med hjem lang tid førend prøven tages.	En litteraturgennemgang kan bruges til at belyse prøvematerialets holdbarhed ved opbevaring under forskellige forhold (f.eks. temperatur, luftfugtighed, tid etc.). <ul style="list-style-type: none"> • Et udtræk fra lab-system kan belyse, om positivraten falder med transporttiden (f.eks. ≤2 døgn sammenlignet med >2 døgn). • Sammenligning af analyseresultatet for prøve med kortest mulige opbevaringstid og prøve opbevaret x-antal dage (der er ikke behov for målinger undervejs, kun behov for måling på maksimalt antal dage). Der kan f.eks. startes med 10 stk. prøver (per target) og hvis der påvises problemer, laves en mere grundig undersøgelse.

Bilag 2: Liste over håndtering af brud på CE-mærkning i forbindelse med en verifikation, fortsat

Gruppe A, fortsat			
Fuldautomatiske systemer			
Område	Ændring	Eksempel	Aktion
Prøver	Opbevaring af primærprøver efter modtagelse.	Eks. fra BD MAX (norovirus/rotavirus), hvor alt opbevares på køl indtil kørsel.	Se "Holdbarhed af prøver efter prøvetagning inden analyse".
Prøveforberedelse	Anden prøveforbehandling end anbefalet.	Eks. fra BD MAX (undersøgelse for norovirus/rotavirus), hvor der af praktiske hensyn foretages anden prøveforbehandling.	Som minimum bør man foretage en sammenligning af den anbefalede forbehandling og den ønskede forbehandling vha. fortyndingsrækker.
	Volumen der anvendes til analyse.	Eks. fra BD MAX, hvor der efter anbefaling fra firma anvendes mindste volumen som kan fungere, for at have nok materiale til gentagelse (norovirus/rotavirus, kighoste).	Som minimum bør man foretage en sammenligning af det anbefalede prøvevolumen og det ønskede prøvevolumen vha. fortyndingsrækker.
	Fortynding af prøver ved gentagelse, hvis mulig hæmning.	Eks. fra BD MAX (norovirus/rotavirus, atypisk, kighoste). Fortynding for at undgå inkonklusive resultater, køres som regel sammen med en ufortyndet.	Ikke behov for yderligere undersøgelser.

Bilag 2: Liste over håndtering af brud på CE-mærkning i forbindelse med en verifikation, fortsat

Gruppe A, fortsat			
Fuldautomatiske systemer			
Område	Ændring	Eksempel	Aktion
Analysen	Andet PCR-program.	Eks. fra BD MAX (norovirus/rotavirus), hvor man af praktiske hensyn (da svar ellers ikke kan nå ud samme dag) anvender et alternativt program, der er anbefalet af firma.	Som minimum bør man foretage en validering af analytisk sensitivitet (hvis firma har data, inddrag da disse). Ændres der på annealingstemperaturen, bør man også forholde sig til en evt. ændret PCR-specificitet under de nye betingelser.
	Andre kontroller.	Eks. fra BD MAX (norovirus/rotavirus), hvor man anvender egne positive kontroller, da de er mere stabile end dem der tilhører kittet.	Ct-/Cp-værdier for de nye kontroller bør som hovedregel ligge omkring samme Ct-/Cp-værdier som firmaets, når disse er friske. Dog bør det overvejes om Ct-/Cp-værdier for firmaets kontroller ligger i relevant område eller om man med fordel kan bruge kontroller med en anden værdi. Overvej procedure for styring af lotnumre for kontrollerne.
	Fremstilling af master mix i batch i stedet for i forbindelse med den enkelte kørsel.	Eks. fra BD MAX (norovirus/rotavirus, kighoste), hvor man gør dette af praktiske hensyn.	Sammenligning af analyseresultat for prøver analyseret med frisk mastermix og prøver analyseret med mastermix opbevaret x-antal dage (der er ikke behov for målinger undervejs, kun behov for måling på maksimalt antal dage). Der kan f.eks. startes med 10 stk. prøver (evt. flere targets pr. prøve) og, hvis der påvises problemer, laves en mere grundig undersøgelse.
Tolkning/besvarelse	"Manuel" tolkning af kurver.	Eks. fra GeneXpert (influenza, RSV, C. difficile, enterovirus). På basis af erfaring med systemet kan svar ændres ift. indbyggede algoritme, hvis det skønnes, at svage positive ikke er tolket korrekt.	Det skal valideres, at prøver man svarer positive, men som apparatet tolker som negative faktisk er sandt positive. Dette kan f.eks. gøres ved at sammenholde med andre undersøgelsesresultater, f.eks. dyrkning, eller prøver analyseret hos andet laboratorium.

Bilag 2: Liste over håndtering af brud på CE-mærkning i forbindelse med en verifikation, fortsat

Gruppe B			
PCR-kit (hvor ekstraktion ikke er inkluderet)			
Område	Ændring	Eksempel	Aktion
Prøver	Prøvemateriale der ikke er valideret.	I undersøgelse for herpes, CMV og EBV fra Altona undersøges prøvemateriale systemet ikke er valideret til. ABI 16S/LSU kit: Kittet er valideret til renkultur og det anvendes også til (ursterile) prøvematerialer.	Se tekst (for samme ændring) under "Gruppe A".
	Transport ved anden temperatur.	Pga. logistik.	Se tekst (for samme ændring) under "Gruppe A".
	Holdbarhed efter prøvetagning inden analyse.	Tid fra prøvetagning til prøvemodtagelse i afdeling forlænget.	Kommentar sættes på svar.
Prøveforberedelse	Ekstraktionsmetode ikke angivet.	FTD Neonatal meningit - der er i kittet angivet EasyMAG, men ikke angivet, hvilken ekstraktionsprotokol, der benyttes til oprensning af denne type prøver. Gælder desuden for FTD - EPA og Bakteriel meningit.	Der bør kræves svar fra firmaet som dermed tager ansvar.

Bilag 2: Liste over håndtering af brud på CE-mærkning i forbindelse med en verifikation, fortsat

Gruppe B, fortsat			
PCR-kit (hvor ekstraktion ikke er inkluderet)			
Område	Ændring	Eksempel	Aktion
Analyse	Anden ekstraktionsmetode/-platform end anbefalet.	Eks. fra Altona og Pathonostics (ifm. undersøgelse for herpes og dermatofytter). Pga. manglende kapacitet anvendes anden ekstraktionsplatform til analysen (herpes). Pga. praktiske hensyn og efter anbefaling fra firma anvendes anden ekstraktionsmetode (dermatofytter).	<ul style="list-style-type: none"> • Anbefalet platform tilgængelig: Sammenligning af de to platforme vha. to fortyndingsrækker. • Anbefalet platform ikke tilgængelig: Bestemmelse af analytisk sensitivitet med den nye platform. Graden af inhibering undersøges ved at sammenholde Ct-/Cp-værdier for IPC i transportmedie med Ct-/Cp-værdier for IPC i negative prøver med prøvemateriale.
	Andet prøvevolumen.	Artus HSV/VZV - Der benyttes et mindre volumen end anbefalet i kittet.	Som minimum bør man foretage en sammenligning af det anbefalede prøvevolumen og det ønskede prøvevolumen vha. fortyndingsrækker.
	Anden ekstraktionsprotokol end anbefalet.	Artus HSV/VZV og R-gene CMV/EBV - Der benyttes en anden protokol til oprensning, men på den anbefalede maskine.	Som minimum bør man foretage en sammenligning af oprensning ved brug af den anbefalede protokol og den ønskede protokol vha. fortyndingsrækker.
	Andet PCR-instrument end valideret.	Eks. med Pathonostics (i forb. med undersøgelse for dermatofytter). Instrumentet ikke til rådighed, hvorfor analysen er indkørt på eget instrument i samarbejde med firma.	<ul style="list-style-type: none"> • Anbefalet platform tilgængelig: Sammenligning af de to platforme vha. to fortyndingsrækker. • Anbefalet platform ikke tilgængelig: Bestemmelse af analytisk sensitivitet med den nye platform. For kvantitativt PCR-kit bør man overveje om linearitet og LoQ stadig er de samme.

Bilag 2: Liste over håndtering af brud på CE-mærkning i forbindelse med en verifikation, fortsat

Gruppe B, fortsat			
PCR-kit (hvor ekstraktion ikke er inkluderet)			
Område	Ændring	Eksempel	Aktion
Analyse	Andet eluatvolumen.	I R-gene CMV/EBV kit elueres i 70 μ l i stedet for de anbefalede 50 μ l.	Som minimum bør man foretage en sammenligning af det anbefalede eluatvolumen og det ønskede eluatvolumen vha. fortyndingsrækker.
	Anden PCR-protokol.	R-Gene respiratorisk panel, FTD EPA, FTD Bakteriel meningit, FTD Neonatal meningit og Roche Lightmix Pneumocystis jirovecii benyttes en anden protokol end den anbefalede.	Se tekst (for samme ændring) under "Gruppe A".

Bilag 2: Liste over håndtering af brud på CE-mærkning i forbindelse med en verifikation, fortsat

Gruppe C			
Ekstraktion af nukleinsyrer (ekstraktionskit eller systemer)			
Område	Ændring	Eksempel	Aktion
Prøver	Reagens anvendt på anden vis end anbefalet.	Rneasy PowerMicrobiome-kit anvendes til oprensning af VRE uden anvendelse af β -mecapthoetanol.	Som minimum bør man foretage en sammenligning af den anbefalede anvendelse og den ønskede anvendelse vha. fortyndingsrækker.
	Prøvemateriale der ikke er valideret.	Qiagen-kit som bruges til DNA-oprensning til helgenomsekventering. Kittet foreskriver oprensning fra flydende bakteriekultur, men der oprenses fra kolonimateriale.	Se tekst (for samme ændring) under "Gruppe A".
Prøveforberedelse	Anden prøveforberedelse end anbefalet.	Anden lysis end anbefalet f.eks. væv lyseret natten over.	Som minimum bør man foretage en sammenligning af anbefalet lyseringsprocedure med den anvendte procedure vha. fortyndingsrækker.
	Volumen der anvendes til analyse.	Der er f.eks. modtaget for lidt prøvemateriale fra rekvirent.	I enkeltstående tilfælde kan denne type prøve påsættes stempel om, at der er modtaget utilstrækkeligt materiale hvorfor svaret bør tolkes med forsigtighed. ISO15189:2013 pkt. 5.4.6.c/ISO15189:2022 pkt. 7.2.6.2 giver mulighed for dette.

Bilag 2: Liste over håndtering af brud på CE-mærkning i forbindelse med en verifikation, fortsat

Gruppe D			
Primer/probe-mix			
Område	Ændring	Eksempel	Aktion
Prøve- forberedelse	Anden mængde prøvemateriale end foreskrevet.	E. coli kit (fra SSI) der analyseres på kolonistrøg selvom det kun er valideret til maks. 10 kolonier.	Hvis der bruges IPC, og denne bruges til at vurdere om der sker PCR-inhibering, behøves ikke ekstra validering. Hvis der ikke anvendes IPC, bør man tage stilling til om den ændrede mængde prøvemateriale påvirker PCR-effektiviteten.
Analyse	Anden IPC end foreskrevet.	Der bruges PhHV i parasitopsæt fra TIB Molbiol i stedet for den kommercielle IPC.	Sammenligning af analyseresultatet for fortyndingsrække tilsat hhv. den nye og den anbefalede IPC. Hvis der påvises problemer laves en mere grundig undersøgelse.
	Andet mastermix end anbefalet.	Der bruges et andet enzym i parasitopsæt fra Tib Molbiol Lightmix Modular end anbefalet.	Sammenligning af analyseresultat for fortyndingsrække med anvendelse af hhv. det validerede mastermix og det enzym, der ønskes anvendt. Man bør tage stilling til, om ændring af enzym har betydning for specificiteten.
	Andre kontroller.	Egne positive kontroller anvendes i influenza-opsæt fra TIB Molbiol, da de er mere stabile end dem der tilhører kittet.	Se tekst (for samme ændring) under "Gruppe A".

Bilag 3: Faktorer til estimering af måleusikkerhed, som ikke er målbare eller som er svært målbare

Nedenstående ikke-målbare faktorer skal overvejes og eventuelt inkluderes i beregning/estimering af måleusikkerhed. Listen er ikke udtømmende, men er ment som inspiration.

	Procestrin	Huskeliste til overvejelser ang. præ- og postanalytiske forhold
Præanalytiske forhold	Prøvetagning	<ul style="list-style-type: none"> • Anvendes de prøvetagningsprotokoller, som er udarbejdet korrekt, og er de tilgængelige for rekvirenten? • Kan rekvirenten forstå prøvetagningsprotokollen? • Har rekvirenten taget prøven fra korrekt lokalisation og sendt i korrekt transportmedie? • Hvorvidt kan anden lokalisation og/eller transportmedie influere på det endelige resultat? • Kan individuel variation (graviditet, faste/ikke faste, medicin) have indflydelse på det endelige resultat?
	Transport	<ul style="list-style-type: none"> • Hvordan skal prøverne transporteres (køl, stuetemp., frost)? • Hvor lang må transporttiden fra patient til laboratorium maksimalt være?
	Prøveopbevaring	<ul style="list-style-type: none"> • Hvor lang tid kan prøven opbevares fra modtagelse til analyse? • Hvilken temperatur skal prøven opbevares ved fra modtagelse til analyse (køl, frys, stuetemp.)?
	Prøvemodtagelse	<ul style="list-style-type: none"> • Hvordan sikres sporbarhed af prøven (automatisk/manuel indtastning i LIS)? • Er der i modtageprocesserne mulighed for ombytning af prøver? • Hvordan fungerer sorteringsprocesserne (automatisk/manuel), hvilke processer kan medføre, at prøver sorteres forkert? • Er prøverøret tæt? • Forsinker modtage- eller sorteringsprocessen svartiden for prøven?
	Prøveforberedelse	<ul style="list-style-type: none"> • Følges de givne laboratorieprotokoller for analysen? • Centrifugering • Kræver prøven fortynding inden opsætning og kan det have indflydelse på det endelige resultat?

	Prøveopsætning	<ul style="list-style-type: none"> • Følges de givne laboratorieprotokoller for analysen? • Er der trin i processen som kan medføre forurening af prøven?
Analytiske forhold	Analyse	<ul style="list-style-type: none"> • Fungerer kontrollerne (positiv, negativ, intern)? • Vurderes amplifikationskurver på samme måde af alle, som udfører analysen? • Fungerer eventuelle automatiske svaralgoritmer for analysen? • Hvordan er performance af analysen i forhold til EQA-paneler? • Hvordan er analysens performance ved test af certificeret referencemateriale?
Postanalytiske forhold	Besvarelse	<ul style="list-style-type: none"> • Fungerer automatisk overførelse fra instrument til LIS og hvordan sikres det rutinemæssigt at overførelse fungerer? • Hvordan sikres korrekt svar ved manuel indtastning i LIS? • Kan rekvirenten forstå det endelige svar og hvordan ser det ud? • Hvordan overføres svar fra LIS til journalsystem hos rekvirent (sygehus/praksis) og hvordan sikres det at overførelse fungerer?
	Opbevaring	<ul style="list-style-type: none"> • Hvor lang tid efter analyse kan prøven gemmes ved korrekt opbevaring og eventuelt re-analyseres?