

RAPPORT

2018

STRATEGIMØTE 2017

Kvalitetskontroll av genteknologiske metoder

Program • Oppsummering • Abstrakter

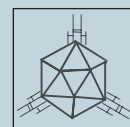
Redaktører:

Andreas Christensen, St. Olavs hospital

Øyvind Kommedal, Haukeland Universitetssjukehus

Garth Tylden, Universitetssykehuset Nord-Norge, Tromsø

Rikard Rykkvin, Folkehelseinstituttet



Referansegruppe for ekstern
kvalitetssikring i virologi og serologi

Strategimøte oktober 2017

**Kvalitetskontroll av
genteknologiske metoder**

Program · Oppsummering · Abstrakter

Redaktører:

Andreas Christensen, St. Olavs hospital

Øyvind Kommedal, Haukeland Universitetssjukehus

Garth Tylden, Universitetssykehuset Nord-Norge, Tromsø

Rikard Rykkvin, Folkehelseinstituttet

Referansegruppen for ekstern kvalitetssikring i virologi og serologi

Utgitt av Folkehelseinstituttet
September 2018

Tittel:

Strategimøte oktober 2017
Kvalitetskontroll av genteknologiske metoder

Forfatter(e):

Andreas Christensen, Øyvind Kommedal, Garth Tylden, Rikard Rykkvin.

Oppdragsgiver:

Referansegruppen for ekstern kvalitetssikring i virologi og serologi

Publikasjonstype:

Strategirapport virologi og serologi

Bestilling:

Rapporten kan lastes ned som pdf
på Folkehelseinstituttets nettsider: www.fhi.no

Grafisk designmal:

Per Kristian Svendsen og Grete Søymer

Grafisk design omslag:

Fete Typer

ISBN elektronisk utgave:

ISBN: 978-82-8082-950-4

Sitering: Christensen A, Kommedal Ø, Tylden G, Rykkvin R. Strategimøte 2017: Kvalitetskontroll av genteknologiske metoder, Folkehelseinstituttet med flere. Rapport september 2018. Tilgjengelig på www.fhi.no

Programmet var satt sammen av en programkomite bestående av Øyvind Kommedal, Garth Tylden, Rikard Rykkvin og Andreas Christensen (leder).

Møteledere var Øyvind Kommedal (del I) og Fredrik Müller (del II).

Programkomiteens medlemmer er også redaktører av rapporten.

Rapporten inneholder oppsummering og anbefalinger slik det kom fram på møtet samt sammendrag av foredragene (manuskriptene) som er gjengitt i sin helhet.

Oslo, august 2018

Innhold

Innledning	4
Program	5
Oppsummering og anbefalinger	6
Design av tester	6
Validering og verifisering – kvalitative analyser	7
Internkontroller	7
Black box-systemer	8
Løpende vurdering av ytelse basert på driftskontroll	9
Kvantitative analyser	10
Kvalitet i den daglige rutine	10
PCR-design	13
Validering og verifisering av genteknologiske metoder	15
Valideringsparametere	16
Verifiseringsparametere	16
«Hvor mange prøver bør inngå i validering/verifisering?»	16
Andre aspekter	16
Spørsmål til diskusjon	16
Referanser	17
Use of Internal Controls in Clinical Molecular Virology Testing	18
Black box-systemer	21
Løpende vurdering av ytelse, avvikskriterier	24
Kvantitative genteknologiske analyser	26
Validering og verifisering	26
Estimering av måleusikkerhet	27
Løpende vurdering av ytelse	28
Referanser	28
Kvalitet i det daglige og feilsøking	29
Deltakerliste	31

Innledning

Andreas Christensen, Avd. for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs hospital

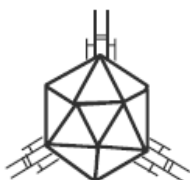
E-post: andreas.christensen@stolav.no

Kvalitetskontroll av infeksjonsserologiske metoder var tema for strategimøtet i 2016 og det er dermed naturlig å følge opp med kvalitetssikring av molekylærgenetiske metoder i år. På møtet i fjor ble det gitt detaljerte anbefalinger om validering/verifisering, internkontroller, usikkerhetsbedømmelse, gråsoner og tolkning. Genteknologiske metoder skiller seg betydelig fra serologi, og kvalitetssikringsrutinene må nødvendigvis være noe ulike. I det medisinsk mikrobiologiske miljø har vi kommet langt mht. genetisk kunnskap, etablering av egne tester, analytisk evaluering og laboratorierutiner (for å unngå forurensning). Den teknologiske utvikling har også kommet langt og vi har meget gode metoder for nukleinsyre-ekstraksjon, amplifikasjon og deteksjon. Likevel, det er noen likhetspunkter mellom serologi og genteknologi og spørsmålet er om vi ikke har litt å lære av serologene. Dette gjelder spesielt for løpende kvalitetskontroll i den daglige rutine basert på driftskontroll og bruk av internasjonale standarder. Validering, verifisering og løpende kvalitetskontroll vil være hovedfokus for dette møtet.

Et annet problem som vi vil møte i økende omfang i tiden framover er knyttet til PCR-teknologiens svært høye sensitivitet. DNA eller RNA fra en rekke mikroorganismer kan være påvisbart i kliniske materialer uten at funnet har klinisk relevans. Dette kan skyldes asymptomatisk primærinfeksjon, persistens eller reaktivering. Problemet er spesielt relevant for brede multiplex-paneler som i dag tas mer og mer i bruk, og det antas å øke enda mer i omfang med neste generasjon sekvensering (NGS). Et betydelig arbeid mht. vurdering av klinisk relevans av ulike funn står foran oss. Tiden er med andre ord ikke moden for å ta brede åpne paneler eller NGS rett inn i rutinediagnostikken. Forskning og grundige valideringer på forhånd er nødvendig. Man bør av samme grunner være tilbakeholden med å ta i bruk kommersielle, såkalte «black-box»-systemer som ikke gir tilgang på fluorescenskurver, primer- eller probesekvenser. Slik informasjon vil være nødvendig for å gjøre lokale valideringer. Denne problematikken vil bli belyst fra ulike sider i løpet av møtet.

Andre aktuelle temaer som kan være aktuelle for diskusjon på møtet, og i tiden framover, er:

- Valg av in-house vs. kommersielle tester
- Bør man rutinemessig vurdere alle kurver?
- Pasientnær diagnostikk. Hvem bør gjøre dette? Bør vi ha døgnberedskap for enkelte PCRer?



”Referansegruppe for ekstern kvalitetssikring i virologi og serologi”
inviterer landets mikrobiologiske laboratorier til strategimøte om

Kvalitetskontroll av genteknologiske metoder

Møtedato:
26.10.2017

Møtested: Gjestehuset, Lovisenberg sykehus, Oslo

Program:

Møteledere: Øyvind Kommedal og Fredrik Müller

Tidspunkt	Tid	Tittel	Foredragsholder
09.45 -10.00	15 min	Frukt og kaffe	
10.00-10.05	5 min	Velkommen Innledning ved leder for referansegruppen	Helvi Holm Samdal
		Del I: Møteleder Øyvind Kommedal	
10.05 -10.20	15 min	Kvalitetssikring av genteknologiske metoder – innledning	Andreas Christensen
10.20 -10.55	35 min	Design av tester, optimalisering	Kåre Bergh
10.55 -11.10	15 min	Kaffepause	
11.10 -11.40	30 min	Validering og verifisering	Fredrik Müller
11.40 -12.05	25 min	Bruk av kontroller	Amir Moghaddam
		Del II: Møteleder Fredrik Müller	
12.05 –12.30	25 min	Kvantitative analyser	Rikard Rykkvin
12.30 -13.30	60 min	Lunsj	
13.30 –13.55	25 min	Løpende vurdering av ytelse, avvikskriterier	Karoline Bragstad
13.55 -14.15	20 min	Black box-systemer	Garth Tylden
14.15 -14.45	30 min	Kvalitet i den daglige rutine og feilsøk	Øyvind Kommedal
14.45 -15.30	45 min	Oppsummering. Anbefalinger	Møteledere

Oppsummering og anbefalinger

Design av tester

Vurdering av primere og probers design samt temperaturprofil og reagenskonsentrasjoner er selvsagte elementer i kvalitetsvurderingen av egenutviklede PCR-tester, men er også helt nødvendige trinn i vurderingen av publiserte og kommersielle tester. Unntak kan gjøres for kommersielle tester der reagenser og sekvenser er bedriftshemmeligheter, men referansegruppen anser ikke dette som en gunstig situasjon. Åpenhet rundt PCR-testers design fremmer faglig utveksling, øker mulighetene for å finne feil og bidrar dermed i siste instans til god diagnostisk kvalitet.

Grad av sekvenslikhet mellom primere/prober og målsekvens vurderes ved hjelp av databasesøk som f.eks. BLAST-søk. Søkemåte og valg av databaser er avgjørende. Vær oppmerksom på at feil forekommer både i databaser og i publiserte sekvenser. NCBI's genbank er den mest omfattende og mest brukte av databasene. Spesifisitet, men også til en viss grad sensitivitet, kan bedømmes elektronisk (in silico) ved slike analyser.

Sjekkliste for design av primere og prober:

- Primere er vanligvis rundt 20 baser lange, prober noe lengre
- Smeltetemperatur for primere ligger oftest i området 50-60 grader
- For prober er det vanlig å legge smeltetemperaturen 5-10 grader høyere
- Arbeidstemperatur («annealing»-temperatur) er oftest 2-5 grader lavere enn smeltepunktet for primere
- Primer-dimerer bør unngås (spesielt i 3' ende)
- Hårnålsformasjoner bør også unngås, men tolereres i større grad enn dimerer
- Repeterende sekvenser bør unngås (maksimum fire di- eller mononukleotider etter hverandre)
- G/C-andelen i 3' ende bør være lav (helst færre enn tre blant de siste fem nukleotidene)
- Degenererte primere bør brukes med forsiktighet, og generelt ikke overstige to til tre degenererte posisjoner per primer-/probesekvens
- Det er stort slingringsmonn når det gjelder PCR-produktets størrelse, men det er vanlig å legge seg på 100-300 basepar for real-time-PCR'er.

Et godt utvalg av programvare er tilgjengelig for sekvens- og strukturanalyser av primere og prober. Det må for øvrig nevnes at tilsynelatende dårlige primere likevel kan fungere ypperlig i praksis.

I dag foretrekkes real-time-formatet i de aller fleste sammenhenger, og deteksjonssystemene TaqMan og FRET dominerer. Sistnevnte muliggjør smeltepunktanalyser. Fluorescerende fargestoffer som binder seg til dobbeltrådet DNA (f.eks. SYBR Green) kan også benyttes som deteksjonssystem, men denne metoden benyttes stadig mindre. Den kan være nyttig til feilsøk ved spørsmål om probesvikt eller til analyser der probe ikke er aktuell som f.eks. 16S-DNA-PCR. Slike fargestoffer er velegnet til smeltepunktanalyser.

Alternative prinsipper som kan bidra til optimalisering av primer- og probedesign er dual priming oligonucleotide (DPO), locked nucleic acid (LNA) eller peptide nucleic acid (PNA).

Måling av en PCR's effektivitet er en essensiell del av kvalitetsvurderingen av en PCR. En effektivitet på 90-110 % tilstrebes. Ved lav effektivitet forsøkes først optimalisering av reaksjonsbetingelsene. Spesielt endringer i annealing-temperatur eller MgCl₂-konsentrasjon kan ha stor betydning. Ved fortsatt lav effektivitet må redesign av primere og prober vurderes.

Validering og verifisering – kvalitative analyser

Ved en validering dokumenterer man at en metode eller test er egnet for sitt formål. Verifisering er mindre omfattende og innebærer at man dokumenterer at testen fungerer i det enkelte laboratorium. Dette vil forutsette at en validering er utført et annet sted.

Genteknologiske metoder for påvisning av mikrobiologiske agens er i dag i stor grad egenutviklede. For slike tester må laboratoriet selv gjøre valideringen. For kommersielle tester eller tester utviklet ved andre laboratorier vil en verifisering være tilstrekkelig. Publikasjoner i vitenskapelige tidsskrifter kan brukes som grunnlag i en validering og vil i så fall kunne redusere omfanget av valideringen.

En validering bør omfatte minimum 40-50 prøver (25% positive, 25% svakt positive og 50% negative). Ved en verifisering kan det være tilstrekkelig med halvparten. Ved validering eller verifisering av tester for sjeldne eller lite kjente agens kan det hende man må klare seg med et lavere antall. Både positive og negative prøver må være av den typen prøvematerialer som testen normalt vil anvendes på.

En detaljert plan må lages på forhånd for både valideringer og verifiseringer og må omfatte metodebeskrivelse, aktuelle prøvematerialer, kontroller, opplæring, kontinuerlig oppfølging, besvarelse i datasystemet, og krav til parametere som skal være tilfredsstillende for en godkjenning. Ved en validering bør parameterne omfatte analytisk spesifisitet, diagnostisk sensitivitet, nøyaktighet, presisjon (repererbarhet og reproducerbarhet), deteksjonsgrense og linearitet (sistnevnte kun for kvantitative metoder). Presisjon kan tallfestes med Cohen's kappa-koeffisient som bør være > 0,75. Ved en verifisering vil det vanligvis være tilstrekkelig med nøyaktighet og presisjon.

En validerings- eller verifiseringsrapport må skrives i etterkant. I denne skal testens ytelse vurderes opp mot kravene som ble stilt på forhånd, og rapporten skal ende med konklusjonen godkjent/ikke godkjent. Referansegruppen oppfordrer til utveksling av valideringsrapporter mellom laboratorier som vurderer identiske tester. Dette vil være betydelig arbeidsbesparende for mottakerlaboratoriene.

Det er i dag krav om CE-merking av egenproduserte PCR-tester. Vi viser i den forbindelse til «Guide for validering og CE-merking av egenutviklede molekylærbiologiske diagnostiske tester». Denne er laget av en arbeidsgruppe for de mikrobiologiske laboratoriene i Norge, og finnes på MikInfo.

Internkontroller

En internkontroll bør være en kontroll som dekker alle trinn i en diagnostisk test, inklusive ekstraksjonen. Dette kan oppnås ved å tilsette kontrollen før ekstraksjonstrinnet (eksogen kontroll) eller ved å undersøke for humant genmateriale som allerede finnes i materialet (endogen kontroll).

DNA-kontroller benyttes for bakterier og DNA-virus. RNA-kontroller benyttes for RNA-virus. RNA-kontroller vil vanligvis være eksogene transkripter, men endogene RNA-kontroller kan også designes. Disse bør inkludere et splicing-sete. Dette vil hindre konkurranse med humant genomisk DNA, som vil inkludere et intron og ikke la seg amplifisere på grunn av den store avstanden mellom primerne.

Bruk av endogene kontroller er praktisk og enkelt ettersom man slipper å preparere og tilsette ekstra materiale. I tillegg får man en kontroll på prøvetakingen. Dette er mest aktuelt for penselprøver og skyllematerialer der kvaliteten på prøvetakingen kan variere betydelig. Endogene kontroller er ikke egnet til cellefattige materialer der mengden humant genmateriale er liten, slik som f.eks. spinalvæsker. I slike tilfeller må man tilsette eksogene kontroller.

Eksogene kontroller har ellers den fordel at konsentrasjonen kan reguleres. Dermed kan man angi et område (Ct-verdi-intervall) som signalet forventes å havne innenfor. Dette øker muligheten til å avdekke partiell inhibisjon, noe som er mest aktuelt for prøvematerialer med stabil kvalitet. En eksogen kontroll vil derfor være hensiktsmessig for materialer som blod, spinalvæsker, serum og leddvæsker. Det samme gjelder for prøvematerialer der hemming er et velkjent problem som for eksempel feces. For kvantitative tester er eksogene kontroller helt nødvendig ettersom disse testene må kalibreres mot kontroller med et definert og stabilt kopitall.

Eksogene kontroller bør tilsettes lyseringsbufferen der dette er mulig. For DNA-kontroller kan man alternativt gjøre tilsetningen i ekstraksjonsmiksen.

Vær oppmerksom på at en internkontroll som kjøres i multiplex med diagnostisk PCR kan konkurrere om nukleotider og enzymer og dermed hemme den diagnostiske PCR-reaksjonen. Dette problemet kan løses ved å bruke lave konsentrasjoner av kontrollprimere og/eller selve kontrollen. Et annet alternativ er å benytte GC-rike kontroller med høyere smeltepunkt enn diagnostisk målsekvens. Med dette favoriserer man diagnostisk PCR. Kontrollreaksjonene får da suboptimale forhold og forbruker mindre reagenser. På den annen side må man passe på å justere forholdene slik at man likevel oppnår robust amplifikasjon. Kontroll-PCR'ene kan alternativt kjøres separat for slik å unngå konkurranse.

Designede kontroller med bindingssteder for testens primere i hver ende, men med ulik sekvens for probe (homologe kontroller), er svært velegnede som inhibisjonskontroller samt som kontroller i kvantitative tester. Her må man dog være spesielt oppmerksom på konkurranse. Reaksjonene vil konkurrere også om primere (ikke bare nukleotider og enzymer).

Internkontroller er ikke nødvendige for PCR'er benyttet til genotyping. Dette er supplerende PCR'er som gjøres på materiale som allerede er konfirmert positive for aktuelle agens. Enda en kontroll ansees unødvendig.

Det bør være et mål at alle nye analyser som innføres har en adekvat internkontroll og at man på sikt også innfører dette på eldre analyser som mangler internkontroll. Tilgjengeligheten på kommersielle kontroller med angitt kopitall blir i dag stadig bedre.

Black box-systemer

Med begrepet «black-box-systemer» menes her kommersielle testsystemer med bedriftsinterne komponenter. Dette innebærer at brukere ikke har innsyn i sentrale prosesser.

Ofte er primer- og probesekvenser hemmelige og fluorescenskurver utilgjengelige. Dette har blitt vanligere i de senere årene og skaper problemer for medisinsk mikrobiologiske laboratorier. Ved vurdering av enkeltresultaters kliniske betydning er man ofte avhengig av slike data. Dette er spesielt aktuelt ved uventede eller avvikende resultater. Med slike systemer overfører man i praksis deler av det medisinske ansvaret til produsenten. Dette mener vi er uheldig, og vi anbefaler derfor at testprodusenter tilgjengeliggjør primer- og probesekvenser, fluorescenskurver og informasjon om ekstraksjonsmetodikk. Ved anskaffelser av nye kommersielle tester anbefaler vi i tillegg at medisinsk mikrobiologiske laboratorier velger åpne systemer med tilgang på amplifikasjonskurver og sekvensdata der dette er mulig. Egenutviklede tester bør av samme grunner foretrekkes der dette er hensiktsmessig.

Resultater fra black box-systemer bør regelmessig kontrolleres med egenutviklede metoder. Løpende bioinformatisk overvåking av treffsikkerheten til alle primere og prober (både tilgjengelige kommersielle og egenutviklede) bør også innføres.

Løpende vurdering av ytelse basert på driftskontroll

Kontinuerlig overvåking av en kvalitativ tests nøyaktighet og presisjon baseres på en positiv driftskontroll med kjent signalstyrke. Det er tilstrekkelig med én kontroll per oppsett. For kommersielle tester kan leverandøruavhengig kontroll benyttes i hvert oppsett, eller som et minimum, ved testing av hver nye batch fra leverandør.

Det er vanlig å fortynne kontrollen slik at den legger seg midt i lineært område for testen med Ct-verdier rundt 28-30. Den positive kontrollen kan være et plasmid eller kun en kjent positiv prøve. Plasmider foretrekkes da disse er lettere å standardisere samt gir mengder nok til å vare i årevis.

Avvikskriteriene er som for serologiske tester og baseres på Westgards regler (se rapporten Kvalitetskontroll av infeksjonsserologiske metoder fra 2016). Erfaring viser dog at en aksjonsgrense på 2 standardavvik ofte er for streng. Variasjonen fra kjøring til kjøring er for stor for kvalitative PCR-analyser, og det har blitt alminnelig å basere seg på ± 2 sykluser (Ct-trinn) i stedet. En like pragmatisk tilnærming vil være å sette minimum CV % til 2,5 %. Dvs. dersom CV % måles til mindre enn 2,5 % i en validering/verifisering så erstattes denne av 2,5 %, som så benyttes til å sette opp aksjonsgrensene. Dette vil gi omtrent samme slingringsmonn som ± 2 Ct-trinn i optimal sone (Ct-verdier mellom 25 og 30), og større slingringsmonn ved svake signaler – noe som kan være gunstig. Her kan man velge den metoden som passer best inn i lokale rutiner og til laboratoriets programvare.

Brudd på Westgards regler bør føre til omkjøring, men man må bruke skjønn. Ved f.eks. for sterk positiv kontroll kan negative resultater godkjennes. Ved hyppige alarmer kan det være aktuelt å gjøre en ny beregning av standardavvik og CV % basert på et større materiale for slik å fange opp mer av den naturlige variasjonen.

I tillegg hører det med en negativ kontroll som mangler templatsekvensen i hvert oppsett. Ethvert utslag i denne kontrollen ansees som avvik.

Løpende bioinformatisk kontroll av primere og prober bør innføres. Jf. avsnittet over om black box-systemer.

Kvantitative analyser

Validering og løpende vurdering av kvantitative genteknologiske analyser følger de samme prinsippene som for kvalitative analyser, men det stilles spesielle krav til beregningene. De forhold som gjelder spesifikt for kvantitative analyser vil bli omtalt her.

Kvantitative genteknologiske analyser er mest aktuelle på materialer som fullblod og plasma. Dette er materialer som det er lett å ta standardiserte prøver av. Analysene anvendes til monitorering av sykdomsforløp eller behandlingseffekt ved infeksjoner med f.eks. HBV, HCV, HIV, CMV eller EBV. For andre materialer som f.eks. luftveismateriale eller biopsier kan såkalt normalisering benyttes. Dette vil ikke bli nærmere omtalt i denne rapporten.

Det er viktig å merke seg at PCR-resultater med benevnningene IU/ml eller kopier/ml ikke er normalfordelte når de uttrykkes på vanlig aritmetisk skala. Fordelingene blir tilnærmet normalisert etter logaritmisk transformasjon og det anbefales derfor at man gjør en \log_{10} -transformasjon før man gjør statistiske beregninger. Ct-verdier representerer tilnærmet \log_2 -transformerte verdier av nukleinsyrekonsentrasjoner og egner seg derfor faktisk også bedre til statistiske beregninger enn aritmetiske konsentrasjonsverdier, men man mister da korreksjonen fra standardkurven. Logtransformerte konsentrasjonsverdier er derfor å foretrekke.

Validering

Presisjon (reproduserbarhet og repeterbarhet) bør oppgis som \log_{10} SD. Den bør dessuten oppgis for tre nivåer (sterkt positiv, svakt positiv og nær deteksjonsgrensen). $SD < 0,19 \log_{10}$ kan aksepteres.

Linearitet beregnes på en fortyningsserie (ofte over et område på 6-7 \log_{10}) og angis med korrelasjonskoeffisienten R^2 (bør være nær 1, minimumsgrense 0,7). Deteksjonsgrensen samt øvre kvantiteringsgrense i lineært område beregnes også i en slik analyse.

Måleusikkerhet avhenger av presisjon beregnet under validering og bør oftest inkluderes i valideringsrapporten til kvantitative analyser. Beregningen baseres på størst påviste standardavvik i testens måleområde og angis som 95 % konfidensintervall. Merk at det endelige konfidensintervallet hvis man rapporterer verdier på en aritmetisk skala vil være asymmetrisk etter \log_{10}/\exp_{10} -transformasjon.

Løpende vurdering av ytelse

Alarmgrensene for driftskontrollen i Lewey-Jennings- eller Westgard-plot bør beregnes etter \log_{10} -transformasjon før de evt. transformeres tilbake som beskrevet over hvis man ønsker å operere med verdier på aritmetisk skala. Omregning av alarmgrensene til Ct-verdier eller kopitall kan gjøres avhengig av laboratoriets rutiner og datasystem. Ettersom kvantitative analyser relateres til en standard kan Westgards regler benyttes. Som nevnt over er disse kriteriene ofte for strenge for kvalitative analyser.

Kvalitet i den daglige rutine

Den daglige vurdering av testresultater sammenholdt med kliniske opplysninger og supplerende undersøkelser er et viktig siste trinn i kvalitetskontrollen av genteknologiske metoder.

Et hyppig problem er svært svake signaler med Ct-verdier rundt 40. Disse kan representere uspesifikke reaksjoner eller svært lav mengde av målsekvens i prøven. Svake uspesifikke reaksjoner kan ellers skyldes probesvikt (såkalt «drop off» eller degradering) som fører til uspesifikk aktivering av fluoroforen. Uspesifikk amplifikasjon av humant genmateriale er en annen mulighet. Det har vært diskutert om man bør innføre gråsoner for PCR-analyser på tilsvarende måte som for serologiske tester. Formen på amplifikasjonskurven, klinisk bilde, type prøvemateriale og tidligere prøveresultater har stor betydning ved vurderingen av slike resultater, og det er derfor vanskelig å holde på et like strengt gråsonesystem som for serologiske tester. Vi anbefaler heller at resultater med Ct-verdier i området 38 og oppover vurderes med spesiell årvåkenhet, og at man har lav terskel for å kjøre slike prøver om igjen. Generelt bør man være forsiktig med å godta positive resultater med Ct-verdier over 40, i alle fall ikke for Taqman-prober som er mest utsatt for probesvikt.

En negativ internkontroll og samtidig negativt resultat bør føre til at aktuelle prøve undersøkes på nytt. Et negativt resultat for positiv kontroll bør føre til at alle negative prøver i et oppsett kjøres på nytt. Positive resultater kan gis ut. Ved andre avvik vil det variere hvorvidt hele eller bare deler av oppsettet bør kjøres om igjen.

Hvis reanalyse ikke løser problemet må man legge en plan for utvidet feilsøk. Vær oppmerksom på at negative internkontroller kan skyldes andre forhold enn inhibitorer i prøvematerialet. Valg av forsendelsesmedium og fortynningsbuffer kan for eksempel påvirke ekstraksjonens effektivitet da enkelte ekstraksjonsmetoder er sensitive for endringer i pH eller saltkonsentrasjoner. Tilstedeværelse av inhibitorer i prøvematerialet kan avdekkes ved å fortynne prøven 1/10 og undersøke denne parallelt med uforynnnet prøve. Dersom den fortyndede prøven gir sterkest signal tyder dette på inhibisjon. Den beste kvalitetskontrollen i daglig rutine er en eksogen internkontroll som tilsettes før ekstraksjon og der man har vurdert og definert et intervall som denne må falle innenfor. Dersom man aksepterer en hvilken som helst Ct-verdi for internkontrollen vil man miste muligheten til å oppdage partiell inhibisjon.

Amplikon-forurensning er i dag et langt mindre problem enn for få år siden. Dette skyldes innføring av real time-teknologi og bruk av uracil N-glykosylase (UNG). Problemet er likevel ikke eliminert, og det er viktig å opprettholde gode laboratorierutiner for å unngå forurensning. Lavgradige forurensninger kan være vanskelige å oppdage og krever årvåkenhet av bioingeniører og leger. Tegn på forurensning kan være positive utslag i negative kontroller, påfallende mange svakt positive prøver per oppsett eller flere positive prøver fra pasienter med lite relevant klinikk. Ved mistanke om forurensning bør første tiltak være å teste et oppsett med kjente negative prøver. Laboratoriet må ha etablerte rutiner for tiltak ved bekreftet forurensning.

Krysskontaminering under prøvebehandling eller PCR-oppsett kan forekomme både i automatiserte og manuelle arbeidsflyter. Tegn på krysskontaminering vil være de samme som for amplikon-forurensning. Ved mistanke om krysskontaminering i automatiserte oppsett bør man kjøre et testoppsett med vekselvis positive og negativ prøver (sjakk-mønster). Ved spørsmål om krysskontaminering av enkeltprøver bør prøven ekstraheres på nytt før omkjøring av PCR, for slik å kontrollere for krysskontaminering også i trinnene før og under ekstraksjon.

Falskt positive resultater i et real time-PCR-oppsett kan som nevnt ha mange årsaker. Avvikende amplifikasjonskurver er hyppig ved uspesifikke reaksjoner (manglende eksponentiell fase er typisk). Alle amplifikasjonskurver bør derfor inspiseres. Det varierer mellom laboratorier hvorvidt det er leger, bioingeniører eller molekylærbiologer som gjør

dette. Det varierer også hvorvidt kurver vurderes av én eller to personer. Det avgjørende er at informasjon om avvikende amplifikasjonskurver når fram til legen som gjør den helhetlige medisinske vurderingen.

Det varierer også fra laboratorium til laboratorium om man kjører enkeltprøver eller dubletter for utvalgte materialer. Vi anbefaler at spinalvæsker fra pasienter med reel mistanke om meningitt eller encefalitt kjøres som dubletter. Ved diskrepans mellom dublettene må begge kjøres på nytt fortynnet og uforynnet. Negativt resultat i alle paralleller ved omkjøring tolkes som uspesifikt resultat i første kjøring. Dublettkjøring øker den diagnostiske presisjon noe, men denne gevinsten må veies opp mot den økte ressursbruken. Strategien er derfor mest aktuell i tilfeller med alvorlig sykdom der resultatet gir behandlingsmessig konsekvens. I de fleste andre tilfeller kan man nøye seg med omkjøring ved usikre resultater, alternativt kan man be om ny prøve.

PCR-design

Kåre Bergh, Avd. for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs hospital

E-post: kare.bergh@stolav.no

I innlegget vil omtales en del grunnleggende momenter for design av PCR med bakgrunn i valg av målseter, oligonukleotid egenskaper, mulighet for å velge metoder avhengig av formålet med analysen. Noen viktige momenter for modifisering av ingredienser og optimalisering av PCR vil bli omtalt.

Bioinformatisk arbeid er nødvendig for å finne egnede målseter, enten via å søke kjente sekvenser fra gener i gendatabaser, eller f.eks etter å ha funnet egnede, evt unike gener fra helgenomsekvenser. Obs! resultatene kan være sterkt avhengig av søkemåte. Etter valg av primerne må spesifisitet *in silico* kontrolleres.

Optimale primere er grunnleggende for PCRs funksjon. Mye er kunnskap basert på empiri, men visse prinsipper er fornuftig å benytte for å lage godt fungerende PCR-assay. Det skal dog bemerkes at teoretisk "håpløse" primere kan vise seg å fungere. Motsatt vil også noe skuffende resultat kunne observeres med teoretisk gode primere.

Mange tar utgangspunkt i ønsket primerlengde, gjerne ca. 18-22 nukleotider (nt) men kan variere ganske mye. Primernes smeltetemperatur vil ofte være i området 50-60 °C og bør være relativt like med differanse < 5 °C. Nukleotidsammensetningen ønskes relativt balansert. Arbeidstemperatur (annealingtemperatur) i PCR vil som regel være noe (ca 2-5 °C) lavere enn primernes smeltetemperatur. Modifikasjoner av primerne kan gjøres for å oppnå ønskede temperaturer, f.eks ved å øke lengde eller endre purin- og pyrimidin-sammensetningen. Dinukleotid-repetisjoner bør ikke overskride 4, rekkefølge av samme nt ("runs") vil ofte være akseptabelt hvis ikke mer enn 4 nt. 3'-ende av primer er kritisk for PCR og bør ikke være for sterkt bundet til templatet (dvs helst maksimum 3 G/C blant de 5 siste nt i 3-enden). Primer dimerer bør søkes unngått, spesielt 3'-endene tilstrebes frie og uten komplementaritet, mens interne bindinger (< 8 nt?) ofte vil kunne tolereres. Det finnes gode dataprogrammer som er nyttige for disse analyser, inkl analyse av hårnålsstrukturer og øvrige momenter for et godt primerdesign.

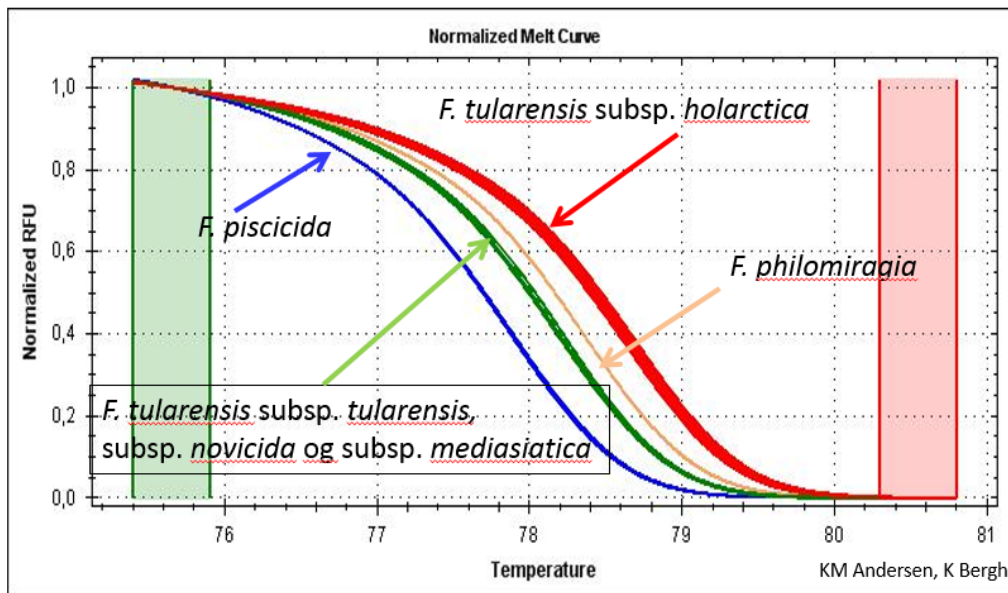
Real-time PCR er klart mest benyttet i dag. Deteksjon av PCR-produkt i real-time kan oppnås ved interkalerende fluoroforer som fluorescerer når bundet til dsDNA (eks SYBR Green, EVA Green). For å oppnå bedre sikkerhet om at PCR-produktet er korrekt kan PCR etterfølges av en smeltepunktanalyse hvor smeltekurven skal sammenfalle med aktuell positiv kontroll. Det kan lages prober med høyere smeltetemperatur enn primerne. Probaserte assay vil derfor kunne gi ytterligere sikkerhet (spesifisitet) for korrekt amplikon. Mest benyttet er 5'eksonuklease sensitiv probe som avgir fluorescens når DNA polymerasen kommer til 5'nt i proben som kuttes (TaqMan-assay) eller ved hybridiseringsprober som avgir signal når begge nært lokaliserte prober samtidig er bundet til templatet, FRET-prober har vært mest benyttet. Hvis behov for å lage en kortere probe vil MGB («Minor-Groove Binding probe») kunne benyttes.

For å forbedre et PCR assay vil modifikasjoner ofte være nødvendig eller ønskelig. Dette kan innbefatte endring mht målsekvensen, men kan også omfatte strategiendring i form av DPO (dual priming oligonucleotide) eller nukleotidmodifikasjoner som LNA (locked nucleic acid) eller PNA (peptide nucleic acid).

Ved siden av PCR for deteksjon av spesifikke gener i definerte organismer, kan PCR benyttes til flere formål: bl.a. kvantitative analyser eller genotypiske analyser f.eks. mutasjonsdeteksjon. En del prinsipper for mutasjonsdeteksjon med og uten bruk av prober vil bli omtalt. Probeuavhengig metode er illustrert nedenfor. FRET-prober og SimpleProbe er eksempler på prober som kan brukes til mutasjonsanalyse.

Eksempel på probeuavhengig mutasjonsdeteksjon basert på interkalerende fluorofor (SYBR Green)

Påvisning av *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* ved SNP-analyse
Mutasjonsdeteksjon i 23S rRNA PCR ved High Resolution Melt analyse:
SNP 2131 T (subsp. *tularensis*) → C (subsp. *holarctica*)



Når innledende analyser viser at PCR fungerer er det nødvendig å optimalisere stringens- og øvrige reaksjonsbetingelser for maksimal sensitivitet og spesifisitet. Verifisering av reaksjonens effektivitet hører med. Ved real-time PCR kan dette enkelt gjøres ved å beregne stigningskoeffisienten i en fortynningsrekke av produktet plottet mot CT-verdier.

Referanser

Et par gode oversikter over momenter knyttet til optimalisering av PCR vil kunne være:

- Kapittel 4 «Optimization of PCR» i PCR Second Edition av M. McPherson og S. Møller, Taylor & Francis Group. (Boken er forøvrig utmerket også som basiskunnskap for PCR).
- Lorentz, T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J. Vis. Exp. (63), e3998, doi: 10.3791/3998 (2012).

Det foreligger mange gode oversikter på produsenters nettsider. Et par eksempler på dette er:

- <http://www.bio-rad.com/en-no/applications-technologies/pcr-assay-design-optimization>
- Selection of Hybridization Probe Sequences for Use with the LightCycler. Roche Molecular Biochemicals Technical Note No. LC 6/99.

Validering og verifisering av genteknologiske metoder

Fredrik Müller, Avdeling for mikrobiologi, Oslo universitetssykehus

E-post: fmuller@ous-hf.no

Krav til validering eller verifisering av metoder er basert på krav i akkrediteringsstandardens NS-EN ISO 15189 (1), disse kravene er nærmere omtalt i NA-dokument 48b (2). Mange av de samme kravene kan gjenfinnes i «IVD-direktivet» (3). Dette vil bli erstattet av IVD-regulativet (4) med virkning fra 2022.

Analysemetodene innen virologi omfatter dels kommersielle tester, dels egenutviklede («in house») tester. Særlig innen nukleinsyrepåvisning er det et betydelig innslag av egenutviklede tester som er i bruk ved mange norske laboratorier. Innen infeksjonsserologi anvendes i all hovedsak kommersielle tester. Kommersielle tester er i hovedsak IVD-godkjent, det vil si at de er validert av produsent i henhold til kravene i IVD-direktivet.

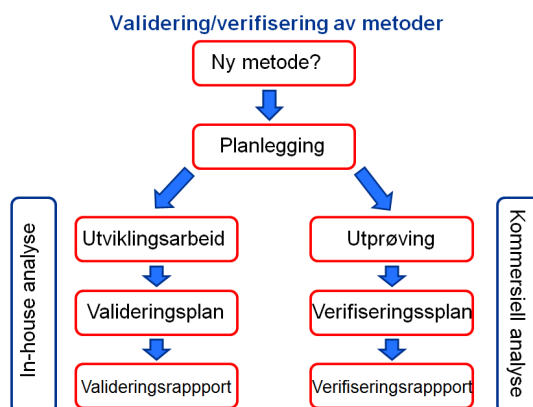
Ved validering av en analysemetode kontrolleres og dokumenteres det at metoden er egnet for sitt formål. Validering er en omfattende prosess. «Validation determines that we are doing the correct test» (5). I følge ISO 15189 skal valideringen være så omfattende som nødvendig, og skal ved framlegging av objektive bevis (i form av analysekarakteristika) bekrefte at de spesielle kravene for den tiltenkte bruken av analysen har blitt oppfylt. Alle egenutviklede metoder må valideres av laboratoriet.

Verifisering av en analysemetode er en mindre omfattende prosess der metodens prestasjoner bekreftes av laboratoriet. «Verification confirms that we are doing the test correctly» (5). Kommersielle, IVD-godkjente metoder må verifiseres av laboratoriet.

Forut for en validering eller verifisering må det gjennomføres en planleggingsprosess der behov for ny analyse vurderes og hvorvidt planlagt analysemetode er egnet for formålet. For egenutviklede metoder vil det også ofte være nødvendig med en utviklingsprosess der ulike metodevarianter prøves ut (*se eget innlegg om design og optimalisering av tester*).

Både ved validering og verifisering må det lages en plan der man definerer hva som skal utføres, hvilke typer prøvemateriale som er aktuelle, hvem som skal gjøre oppgavene, tidsbruk og hvem som er ansvarlige. Det er viktig å definere godkjenningsskriterier for metoden i planen. En person (med godkjent kompetanse) må angis som valideringsansvarlig for metoden. Der valideringsansvarlig ikke er lege, vil det være nødvendig også å ha med en medisinsk-faglig ansvarlig. Både egne data og data fra litteratur, leverandør, andre laboratorier etc kan inngå i valideringen/verifiseringen.

Når arbeidet er utført etter plan, skrives det en rapport der resultatene presenteres og der det konkluderes hvorvidt analysens godkjenningsskriterier er innfridd og om analysen er egnet for formålet.



I tillegg er det en rekke andre forhold som må på plass før analysen kan tas i bruk, så som valg og innstilling av kontroller og valg av SLP (sammenliknende laboratorieprøving)-program (*se eget innlegg om bruk av kontroller*), metodebeskrivelse (prosedyre), eventuelle endringer i andre dokumenter i kvalitetssystemet, opplæring av personell, endringer i laboratoriedatasystemet, valg av økonomiske takster, eventuell fleksibel akkreditering (om relevant), mv. Dette kan f eks dokumenteres i en endringskontroll med utgangspunkt i en mal der disse momentene er tatt med og der tidspunkt for iverksetting av metoden dokumenteres.

Valideringsparametere

Valideringsparametere må velges og begrunnes. En rekke parametere kan være relevante: Spesifisitet, riktighet, presisjon (repeterbarhet, reproduserbarhet), deteksjonsgrense, interferens, sporbarhet, robusthet og PCR-effektivitet (når relevant). For kvantitative metoder vil parametere som linearitet, måleområde og kvantiteringsgrense også være relevante (*se eget innlegg om kvantitative metoder*).

Verifiseringsparametere

Her er kravene mindre omfattende. Aktuelle parametere kan være riktighet, presisjon (repeterbarhet, reproduserbarhet), spesifisitet, mv.

«Hvor mange prøver bør inngå i validering/verifisering?»

Antall prøver som skal inkluderes i en validering eller verifisering må baseres på statistiske vurderinger. Flere publikasjoner gir forslag til prøveantall, bl.a. referanse 5 og 6.

Andre aspekter

Preanalytiske forhold, instrumenter og annet utstyr (med krav til vedlikehold, service mv), tilkobling til laboratoriedatasystemet (krever verifisering), lokaler, opplæring og godkjenning av personell, postanalytiske forhold, mv må også vurderes. I tillegg må det settes opp en plan for oppfølging av metoden (*se eget innlegg om løpende vurdering av ytelse og avvikskriterier*).

Spørsmål til diskusjon

- Bør laboratoriene i større grad samarbeide om valideringer og verifiseringer?
- Hvordan sørger vi for tilstrekkelig opplæring i validering og verifisering innen medisinsk mikrobiologi?
- Nytt IVD-regulativ: I hvilken grad kan vi fortsette med egenproduserte tester i de kommende år?

Referanser

1. NS-EN ISO 15189:2012: Medisinske laboratorier. Krav til kvalitet og kompetanse.
2. NA-Dok nr. 48b. Medisinsk mikrobiologi. Norsk akkreditering, 2016.
3. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A31998L0079>
4. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32017R0746>
5. Jennings L, Van Deerlin VM, Gulley MI. Recommended Principles and Practices for Validating Clinical Molecular Pathology Tests. Arch Pathol Lab Med 2009; 133; 743-55.
6. Burd EM. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. Clin Microbiol Rev 2010; 23: 550-76.

Use of Internal Controls in Clinical Molecular Virology Testing

Amir Moghaddam, Først Medisinsk Laboratorium, Søren Bulls vei 25, 1051 Oslo

E-post: amoghaddam@furst.no

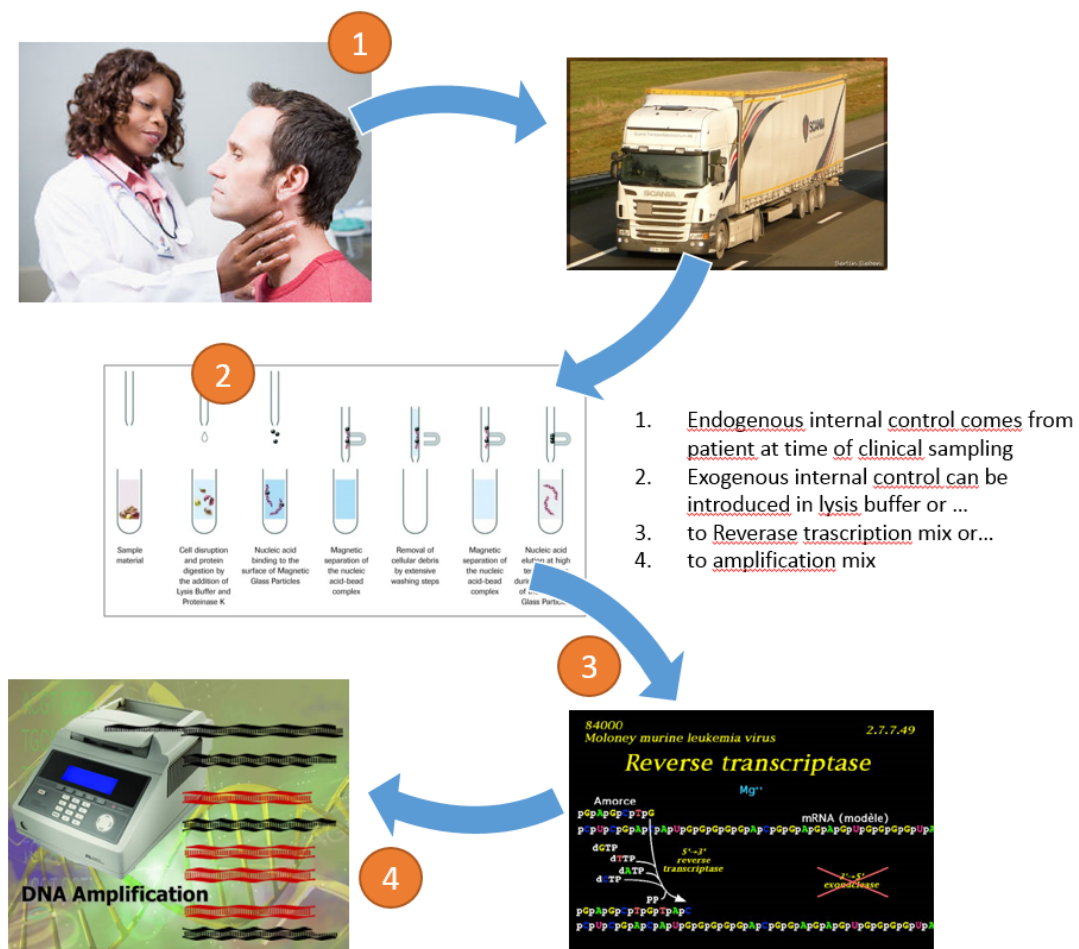
Nucleic acid amplification tests (NAATs) for viral targets make use of internal controls to monitor sample extraction and inhibition of reverse transcription, amplification and detection. Internal control is crucial in clinical molecular virology tests, in order to report negative patient results with confidence. For RNA viruses, use of RNA internal control is crucial to monitor reverse transcription inhibition, whilst for DNA viruses, DNA internal control is preferred. Endogenous controls make use of DNA or RNA present in patient's samples and are ideal to monitor the entire process of patient sampling, nucleic acid extraction, reverse transcription if necessary, and amplification. However, it is difficult to have a uniform copy number for endogenous internal controls. Spiking with exogenous internal control is the most practical and preferred method in most routine clinical laboratories. Exogenous controls can make use of same primers as the viral target sequence but with an altered probe binding site and these are referred to as competitive internal controls. Non-competitive internal controls make use of completely unrelated primers and probes. Exogenous internal controls can be spiked into the sample at the same time as lysis buffers, or in the reverse transcription/amplification master mix.

The choice of internal control will depend on several factors and below are guidelines in choosing the appropriate internal control with examples and references. The list is not exhaustive but a guide line. We are assuming that clinical samples to be tested are primary samples from patients and not cultured.

1. An Endogenous internal control, ie human DNA or mRNA, should be chosen whenever testing for cellularity of the sample gives confidence to quality of sampling, transport, nucleic acid extraction and NAAT test.
 - Examples of target include Rnase P gene, β -globin gene, GAPDH, endogenous retrovirus¹
 - If targeting RNA, amplification should go across a large intron so that amplification is from cDNA and not gDNA.
 - An example is testing for HPV where it is important to know that sufficient number of cells have been sampled from the cervix.
 - Another example is when testing for viruses in paraffin sections, lesions, Bronchoalveolar lavage and cerebral spinal fluid. A test for human DNA or mRNA will show that extraction of nucleic acid from the section has been successful².
 - Some samples are highly cellular (e.g. nasopharyngeal swab scrapings) and test for human DNA/RNA may out compete the virus of interest if performed in multiplex.
 - Samples such as serum, plasma urine, stool, although it is possible to detect human DNA and to use that as endogenous internal control, the result will vary from one sample to another greatly and difficult to standardize for routine analysis and to meet CE-IVD requirements.
2. Exogenous internal controls, e.g. in vitro transcribed RNA, plasmid DNA, DNA amplicons, Armoured-RNA³ should be introduced into the lysis buffer, prior to extraction from clinical sample, whenever possible. The controls need to be

titrated so as not to compete with the target during reverse transcription, amplification and detection. New automated extraction platforms may not allow altering volume of lysis buffers in troughs and may not allow easy mixing in of exogenous internal controls.

3. Exogenous RNA internal controls should be added to lysis buffers to allow control of downstream detection of RNase activity and inhibition. An example is NAATs for HCV and HIV.
4. Exogenous DNA internal controls can be added to amplification mix, if adding to lysis buffer prior to extraction is not desired or practical.
5. Primers for the internal control and the amount of internal control should be such that amplification of internal control does not compete with amplification of target⁴. Some laboratories use internal controls with high GC rich content to make them uncompetitive⁵.
6. Internal controls with same primer binding sequences as target virus can compete with the target, however, they are useful for controlling for PCR inhibition⁶ and quantification.
7. Generally, when performing virus typing assays or drug resistance testing, internal control is not required as long as all virus types are covered in the assay.



References

1. Whiley DM, Mackay IM, Sirmis MW, Witt MJ, Sloots TP. Detection and differentiation of herpes simplex virus types 1 and 2 by a duplex LightCycler PCR that incorporates an internal control PCR reaction. *J Clin Virol* 2004;30(1):32–8.
2. Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, et al. Detection of Herpes Viruses by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Lung Injury or Acute Respiratory Distress Syndrome. *Respiration* 2014;87(4):279–86.
3. Zhao L, Li R, Liu A, Zhao S. A novel duplex real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction for rubella virus with armored RNA as a noncompetitive internal positive control. *J Virol Methods* 2015;219:84–9.
4. Hoffmann B, Beer M, Schelp C, Schirrmeier H, Depner K. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Methods*. 2005;130(1–2):36–44.
5. Dingle KE, Crook D, Jeffery K. Stable and noncompetitive RNA internal control for routine clinical diagnostic reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42(3):1003–11.
6. Hartleif S, Göhring K, Goelz R, Jahn G, Hamprecht K. Quantitative monitoring of HCMV DNA lactia in human milk by real time PCR assay: Implementation of internal control contributes to standardization and quality control. *J Virol Methods* 2016;237:101–6.

Black box-systemer

Garth Tylden, Avdeling for mikrobiologi og smittevern, Universitetssykehuset Nord-Norge, Tromsø

E-post: garth.tylden@unn.no

Black box er en betegnelse for prosesser eller instrumenter med komponenter som er ukjente for brukeren. I klinisk mikrobiologi gjelder dette kommersielle analyser med ulike bedriftsinterne komponenter.

Verifisering av black box metoder er uproblematisk og baserer seg på sammenligning med tidligere verifiserte metoder med utvalgte pasientprøver og sammenlignende prøver (SLP). Løpende kvalitetssikring krever deltagelse i SLP-programmer og overvåkning av kit avhengige og uavhengige kontroller (se innlegg om validering og verifisering i denne rapporten og virologisk strategirapport 2016: Kvalitetskontroll av infeksjonsserologiske metoder).

Flere av våre viktigste analyser utføres med kommersielle black box systemer. Dels skyldes dette at det lenge har vært lovpålagt å bruke CE-merkede metoder for blodsmittetvirus og visse andre kommersielt viktige agens, plassert i kategori A og B i EU direktiv 98/79/EC og lov om medisinsk utstyr. For en del andre agens har det senere kommet kommersielle analyser med et-trinns håndtering. Disse er attraktive for bruk i akutte situasjoner, utenfor laboratoriets åpningstid og for å utvide det diagnostiske repertoaret på enkelt vis.

Hemmelighold av nukleotidsekvensene til prøber og primere er et problematisk aspekt ved mange black box analyser. Kontroll av analysens sensitivitet og spesifisitet mot publiserte sekvenser er da ikke mulig for brukeren. Viktige aspekter av det medisinske ansvaret overlates dermed til produsenten.

Kommersielle analyser er ikke alltid de beste analysene. Genetiske endringer som stadig oppstår hos mikroorganismer og svakheter i metodedesign kan føre til diagnostisk svikt. Svikt i kommersielle analyser har ført til både under- [1] og overdiagnostisering [2]. Betydningen av diagnostisk svikt for folkehelsen understrekes ved frem-seleksjon av diagnostisk-escape-varianter i befolkningen [3]. Egenutviklede metoder kan forandres raskt for å ta høyde for nye sekvensvarianter. Da økonomiske hensyn veier tyngst for produsentene, faller ikke deres interesser alltid sammen med helseforetakenes og pasientenes interesser og utbedring av kommersielle metoder kan ta lang tid.

Forandringer i regulering og fremskritt innenfor automatisering [4] og *in silico*-validering av diagnostiske PCR-analyser varsler endrede forhold for egenutviklede vs. kommersielle analyser i løpet av neste tiår.

Den nye EU-reguleringen (EU/2017/746), gjeldende fra 2022, erstatter agenslistene A og B med en inndeling fra A-D basert på materiale, sykdommens alvorlighetsgrad, smittmekanisme og smittefare. Den nye kategoriseringen skaper rom for tolkning men det er likevel klart at flere agens vil kreve CE-godkjente analyser. Kravene til CE-godkjenning blir også skjerpet. Samtidig fritas akkrediterte laboratorier fra krav om CE-godkjenning under en rekke forutsetninger, deriblant at driften begrenses til «ikke-industriell skala» og at det ikke finnes markedsførte, CE-godkjente analyser som tilfredsstillende «pasientgruppens spesifikke behov på et passende ytelsesnivå».

Fremskritt med automatisering av egenutviklede PCR analyser kan gjøre laboratoriene i stand til å sette sammen et repertoar av analyser som passer til pasientene i laboratoriets

nedslagsfelt med stor grad av fleksibilitet og effektivitet. Det viktigste fremskrittet er utvikling av universelle PCR betingelser slik at helt ulike agens fra ulike materialer kan detekteres samtidig i samme PCR oppsett [4]. Dette betyr at småskala analyser kan potensielt utføres med tilnærmet lik effektivitet som storskala analyser.

In silico- eller elektronisk validering av diagnostiske PCR-analyser går ut på å estimere spesifisitet og sensitivitet elektronisk. Sekvensene til primere og prober sjekkes mot mikrobielle og humane sekvenser fra databaser for predikert spesifikk og uspesifikk binding, amplifikasjon og deteksjon. Mange variabler påvirker resultatene, inkludert valg av database, søkebegrep (nukleotidsekvensene som danner søkegrunnlaget), mismatch-toleranse, og metoder for å finne sekvenser som PCR-analysen ikke vil kunne detektere men som bør detekteres (sterkt forandret eller manglende primer/probe-bindingssteder hos en sann patogen). Svenske Folkhälsomyndigheten har utviklet et program for elektronisk validering av diagnostisk PCR kalt SmiPrimer [5]. Folkhälsomyndigheten tilbyr SmiPrimer som en tjeneste hvor PCR-analyser innlosjeres for kontinuerlig overvåkning av validitet i henhold til tilgjengelig sekvensdata.

Systematisk elektronisk overvåkning av PCR-validitet er hittil ikke etablert i Norge. De enkelte laboratoriene bruker ulike varianter av BLAST analyser (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kombinert med manuelle mismatch-analyser. Slike søkealgoritmer tester hovedsakelig spesifisitet. Et komplett estimat av sensitivitet kan ikke fås siden sekvenser hentes frem basert på likhet med søkebegrepet. Man får altså ikke oversikt over sekvenser med omfattende mutasjoner eller hvor bindingssteder mangler totalt. Med den stadig økende mengden sekvensdata, vil manuell bearbeiding raskt bli for omfattende for rutine-diagnostiske laboratorier. Det voksende datagrunnlaget øker samtidig relevansen av elektronisk validering for løpende kvalitetssikring av diagnostisk PCR.

Det er behov for å bygge opp kompetanse og utvikle verktøy for overvåkning av PCR-validitet i Norge. Etablering av et sentralisert tilbud vil gi flere fordeler, deriblant forenklet etablering, og løpende kvalitetssikring av egenutviklede PCR for laboratoriene. Man vil kunne få en oversikt over samlet analytisk beredskap i landet på sekvensnivå. Informasjonen om forventet ytelse av de enkelte analysene vil hjelpe laboratoriene med å definere et «**passende ytelsesnivå**» for kommersielle analyser.

Bruk av black box metoder kan sees på som «outsourcing» av det bioteknologiske arbeidet. Dette svekker fagutviklingen i medisinsk mikrobiologi. For å trygge diagnostikken og sikre fagutviklingen bør bruken av black box metoder begrenses. Negative, positive og kvantitative resultater fra black box metoder bør kontrolleres med egenproduserte analyser, med en hyppighet som avhenger av metoden som skal kontrolleres. Et referansesenter for *in silico*-overvåkning av laboratorienes egenproduserte PCR analyser bør etableres.

Anbefalinger

- Begrense bruken av analyser med skjulte primer/probe-sekvenser
 - Pasientnære analyser begrenses til ø-hjelp og utenfor vanlig arbeidstid
 - Resultater bør kontrolleres med alternative metoder
- Opprette en sentralisert tjeneste for *in silico* overvåkning av PCR-validitet
 - Kontrollerer primere og prober mot publiserte sekvenser
 - Rapporterer om svikt i predikert spesifisitet og sensitivitet

- Landsdekkende løpende oversikt av *in silico* PCR-validitet
- Setter standard for akseptabel *in silico* kvalitetskontroll for kommersielle aktører

Referanser

1. Ripa, T. and P.A. Nilsson, A Chlamydia trachomatis strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic acid amplification tests. *Sex Transm Dis*, 2007. 34(5): p. 255-6.
2. Blanc, D.S., et al., High Proportion of Wrongly Identified Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Carriers by Use of a Rapid Commercial PCR Assay Due to Presence of Staphylococcal Cassette Chromosome Element Lacking the mecA Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011. 49(2): p. 722-724.
3. Klint, M., et al., Prevalence trends in Sweden for the new variant of Chlamydia trachomatis. *Clinical Microbiology and Infection*, 2011. 17(5): p. 683-689.
4. Greub, G., et al., Ten years of R&D and full automation in molecular diagnosis. *Future Microbiology*, 2016. 11(3): p. 403-425.
5. Alm, E., Utveckling av ett automatiskt varningssystem för primers och probes. 2016, Folkhälsomyndigheten.

Løpende vurdering av ytelse, avvikskriterier

Karoline Bragstad, Avdeling for Influensa, Folkehelseinstituttet

E-post: karoline.bragstad@fhi.no

Polymerasekjederaksjon (PCR) utgjør i dag en stor del av diagnostikken innenfor både bakteriologi og virologi og er grunnsteinen for videre avanserte analyser, fra isolering av spesifikke gener til dybdesekvensering av hele genom, og har dermed blitt en av de mest brukte laboratorieteknikkene. Ved bruk av hydrolyseprober er diagnostikk og overvåking mulig i sann tid. Økningen av rapporter fluorescens er proporsjonal med mengden av amplikon målt med høy følsomhet. Nettopp på grunn av den høye følsomheten, er det viktig med kvalitetssikring / kvalitetskontroll (QA / QC) for å forhindre kontaminering og falskt positive eller negative resultater.

Hovedmålet med velfungerende real-time PCR-analyser er å produsere data som er vitenskapelig gyldig, juridisk forsvarlig og av kjent og dokumentert kvalitet i samsvar med nasjonale og gjerne internasjonale anerkjente standarder. Vurdering av ytelse gjøres på bakgrunn av kontrollmaterialene som inkluderes i analysen, både innenfor en analysekjørsel, men også på analyser utført over tid. Hvor mye avvik kan tillates, eller hvor ofte tillates det at avvik foregår, for at en analyse oppfyller kvalitetskravet og hvordan måles dette best? Ytelsesmonitorering brukes for å bestemme status på en prøve som godkjent/ikke godkjent i diagnostisk assay og samtidig løpende vurdering og forbedring av ytelsen. Verdier fra gjentatt testing av kvalitetskontroller bør registreres ved hvert bruk, bli evaluert statistisk over tid og ytelsesintervall vurderes med jevne mellomrom.

Foruten kontroll på de fysiske rammene rundt en analyse som lokaler, utstyr, personale, reagenser og gode rutiner generelt så må det gjøres løpende kontroll og vurdering av en analyse og for kvalitative analyser står Levey-Jennings plot og Westgard reglene sentralt. For noen analyser kan det være aktuelt å sette en enkel kontrollterskel som gjerne er et gjennomsnitt av verdier for et kontrollmateriale pluss eller minus 2 eller tre standardavvik. Dersom ikke regelen settes for strengt så vil en enkeltregel-kvalitetskontrollprosedyre kunne gi en akseptabelt lav avvissingsrate, spesielt hvis viktige feil også kan påvises i 90% av gangene. En slik prosedyre er ofte tilstrekkelig ved høyautomatiske og veldig presise analyser. For bedre å kunne påvise analytiske feil med metoden og få et lavere nivå av falske avvissinger av analyser så brukes gjerne multiregel-kvalitetskontroll isteden. Regelen brukes gjerne dersom feil i analysen vanskeligere kan påvises. Det brukes en kombinasjon av kontrollregler for å bestemme om en analysekjørsel er innenfor eller ute av kontroll. Med Westgard-prosedyren brukes 5 forskjellige kontrollregler for å bestemme akseptansen av en analytisk kjørsel. Trender brukes også ofte som en egen kontrollregel, men da kan det gå tid før feil oppdages.

I dag finnes det templatfiler for nedlasting og egne programmer for føring av kontrollverdier noe som gjør løpende vurdering av analyser mer standardisert og forenklet. Datagrunnlaget bør minst inkludere 10 datapunkter fra uavhengige analyser og hvor «outlayers» er ekskludert. Nye gjennomsnitt bør generes hvert 10-20 analysekjørsel og gjennomsnittene bør holdes opp mot hverandre over tid og akseptantsintervall for verdiene løpende vurderes. Kontrollene bør ligne mest mulig prøvene man skal analysere og i de fleste tilfeller ha en konsentrasjon som ligger 10-100 ganger høyere enn deteksjonsgrensen til analysen. En for «god» kontroll vil ikke kunne signalisere feil ved analysen like godt. Hvilke tiltak som skal iverksettes basert på den løpende overvåkingen

av analysen avhenger veldig av analysen og de kriterier som er satt for å akseptere en positiv prøve.

Nyutviklede analyser på nye agens, eller nye prøvematerialer kan kreve større grad av kontrollbehov enn analyser hvor man er godt kjent med prøvematerialet eller agens. Dersom det agens som inngår i analysen forandrer seg over tid, vil løpende vurdering av primersekvenser være essensielt for hvordan analysen fungerer. Det finnes programmer i dag hvor et bibliotek av primere automatisk kan vurderes opp mot et referansesett av agens for løpende vurdering av primer mismatch. Manuell bioinformatisk analyse av primere ved hurtig varierende agens er tidkrevende og blir ofte en flaskehals i vurderingsarbeidet med en analyse.

Det er mange faktorer å ta hensyn til og med visse grunnprinsipper i bunn så må det gjøres en individuell vurdering for hver analyse om hvilke faktorer som skal inngå i den løpende vurderingen og hvilke kriterier som skal være gjeldende for å sikre en analyse som er stabilt og som man kan stole på.

Referanser

- Westgard, Basic Quality control Practices, ISBN 1-886958-30-0
- Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. Clin Chem 1981;27:493-501.
- www.westgard.com

Kvantitative genteknologiske analyser

Rikard Rykkvin, Avdeling for tuberkulose, blod- og seksuell smitte, Folkehelseinstituttet

E-post: rikard.rykkvin@fhi.no

Validering og verifisering

Mange av elementene som inngår i validering og verifisering er de samme for kvalitative som for kvantitative analysemetoder. I det følgende omtales de parametere som enten kun er relevante for kvantitative metoder eller som må beregnes annerledes når metoden er kvantitativ.

Generelt ved statistisk behandling av måleresultater fra kvantitative genteknologiske metoder hvor verdiene oppgis på aritmetisk skala (for eksempel IU/ml i absolutte tall) anbefales å først logtransformere verdiene som skal analyseres [1, 2], fordi:

1. Den fundamentale måleenheten som kvantitativ PCR utledes fra (CT-verdier) er logaritmisk i sin natur (\log_2 ved perfekt PCR-effektivitet), mens aritmetiske absolutte verdier som oppgis som sluttresultat er anti-logtransformert fra CT-verdiene (og standardisert). Dette tilsier at serier av logtransformerte måleresultater vil være nærmere normalfordelt enn lineære måleserier, og dermed egne seg bedre for statistisk behandling.
2. Metodene har et bredt måleområde.

Riktighet

Til forskjell fra kvalitative tester hvor riktighet undersøkes ved å beregne diagnostisk sensitivitet, spesifisitet og eventuelt Cohen's kappa, anbefales det for kvantitative tester å plote parvise målinger utført med ny vs. etablert metode (forventet verdi). Man bør inkludere minst 40 (validering) eller 20 (verifisering) prøver fordelt for eksempel som 1/3 negative, 1/3 lave positive og 1/3 høye positive prøver [3].

1. Spredningsplott / XY-plott. De parvise målingene plottes som (X,Y). Regresjonslinjen i plottet bør ha stigningstall nær 1 (ingen proporsjonal bias) og skjæringspunktet i y-aksen nær 0 (ingen konstant bias).
2. Bland-Altman plott, hvor gjennomsnittet av hver parvise måling plottes på x-aksen og differansen innen hver parvise måling på y-aksen. Man beregner og plotter også linjer for gjennomsnittet av differansene (som bør være nær 0 når det ikke foreligger bias) og 95% konfidensintervall for gjennomsnittene, og kan da gjøre en visuell vurdering av metodenes samsvar gjennom måleområdet. Hvis 95% konfidensintervall inneholder 0, er det ingen statistiske holdepunkter for bias. Klinisk betydning av bias bør også tas med i vurderingen, og noen kilder oppgir $<0,3$ log i gjennomsnittlig differanse som akseptabelt innen molekylærvirologi [3].

Presisjon

Presisjon vurderes både mtp. intraseriell presisjon («reperbarhet») og interseriell presisjon («reproduserbarhet», hvis faktorer som laboratorie, lotnr., operatør, dag osv. varierer). Siden man bør regne på logtransformerte verdier (se ovenfor), følger det at man beregner gjennomsnitt og SD uttrykt i \log_{10} . Variasjonskoeffisienten (CV%) som man bruker for å uttrykke variasjon for målinger på en aritmetisk skala er misvisende for

målinger på en logaritmisk skala (eksempel: et sett målinger med gjennomsnitt $2 \log_{10}$ IU/ml og SD $0,2 \log_{10}$ og et annet sett målinger med gjennomsnitt $5 \log_{10}$ IU/ml med samme SD $0,2 \log_{10}$ har det samme standardavviket på begge nivåer, men hvis man beregner CV% vil den bli 10% vs 4%).

Presisjon for kvantitative genteknologiske tester vil ofte variere gjennom måleområdet, med større spredning i det høye og lave måleområdet enn i middelområdet, og det er derfor anbefalt som minimum å inkludere en sterk positiv prøve, en svak positiv prøve og en prøve med konsentrasjon så nær deteksjonsgrensen som mulig [1]. Det er ingen allmenn enighet om akseptabelt presisjonsnivå for verifisering av kvantitative genteknologiske tester, men $SD < 0.19 \log_{10}$ er foreslått [3]. Man bør tilstrebe å minst oppnå produsentens oppgitte intra-/ interserielle presisjon [3], som oftest oppgis i SD \log_{10} differensiert for ulike konsentrasjonsnivåer, og det er derfor hensiktsmessig å velge sine kontrollmaterialer utifra dette. Det foreligger mange forslag til antall prøver, replikater, oppsett og dager for å estimere intraseriell og interseriell presisjon [1-3], og generelt vil de være mindre omfattende for verifisering enn validering. For validering anbefales å utføre oppsett hver dag i 20 dager [2], men det kan da gjøres singlikat- eller evt. duplikattesting. Siden både validering og verifisering av metodene er tidkrevende og eventuelt kostbart, bør man nøye sette opp eksperimentserier som i kombinasjon dekker alle ønskede parametre samtidig.

Linearitet

Linearitet er testens evne til å produsere måleverdier som er direkte proporsjonale med konsentrasjonen av analytt i prøven. Linearitet testes ved hjelp av en serie fortynningsprøver som går fra noe lavere til noe høyere enn testens kjente eller antatte måleområde, og som kan presenteres i et spredningsplott og analyseres med for eksempel lineær regresjon. Korrelasjonskoeffisienten R^2 bør være nær 1. Ved bruk av polynomisk regresjonsanalyse kan man evt. eliminere prøvene med laveste eller høyeste konsentrasjon helt til man finner en lineær sammenheng. Laveste gjenværende konsentrasjon vil da representere nedre kvantiteringsgrense (LLOQ, lower limit of quantification), mens høyeste konsentrasjon representerer øvre kvantiteringsgrense (ULOQ, upper limit of quantification). Ved verifisering kan bekreftelse av linearitet gjøres noe mindre omfattende, og det er tilstrekkelig å analysere 2 replikater i 5-7 fortyninger som dekker testens oppgitte måleområde [1].

Estimering av måleusikkerhet

Måleusikkerheten avhenger av testens presisjon, og skal estimeres for alle kvantitative analyser [4]. Den bør fremgå av analyserapportene, med mindre den er gjort til gjenstand for forenklet rapportering. Som nevnt vil ofte presisjonen, uttrykt ved SD \log_{10} variere gjennom det kvantitative måleområdet for genteknologiske metoder. Hvis ikke variasjonen er for stor, er det en mulighet å finne det største påviste standardavviket fra verifisering/validering, for eksempel $0,15 \log_{10}$, og angi for alle prøvesvar i det kvantitative måleområdet at 95% konfidensintervall utgjør *opptil* $\pm 0,3 \log_{10}$ ($1.96SD$). Hvis prøvesvar oppgis på aritmetisk skala på analyserapportene (for eksempel 100 000 IU/ml), kan man logtransformere resultatet, regne ut et korrekt symmetrisk 95% konfidensintervall på den logaritmiske skalaen, og deretter bruke anti-log til å få et korrekt assymmetrisk 95% konfidensintervall på aritmetisk skala. Ved FHI har vi programmert algoritmer med formler i laboratedatasystemet som utfører disse beregningene automatisk når et gitt resultat på aritmetisk skala legges inn.

Løpende vurdering av ytelse

Temaet tas opp bredt i foregående innlegg. Et viktig poeng som er spesielt for kvantitativ PCR er at måleverdiene som registreres i Lewey-Jennings-diagram etc og som danner grunnlaget for alarm- og aksjonsgrenser bør være logaritmiske (se begrunnelse ovenfor). Hvis instrumentet produserer verdier på aritmetisk skala kan de enkelt logtransformeres i Excel før plotting. Rene CT-verdier er også logaritmiske i natur, men er mindre nøyaktige sammenlignet med transformerte måleverdier, fordi CT-verdiene ikke er standardisert med standardkurve.

Referanser

1. Burd, E.M., Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. 2010.
2. Jennings, L., V.M. Van Deerlin, and M.L. Gulley, Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests. Arch Pathol Lab Med, 2009. 133(5): p. 743-55.
3. Newman, H., et al., Basic overview of method validation in the clinical virology laboratory. Reviews in Medical Virology, 2017. 27(5).
4. Akkreditering, N., NA Dok. nr. 48b. Medisinsk mikrobiologi. 2016.

Kvalitet i det daglige og feilsøking

Øyvind Kommedal, Mikrobiologisk avdeling, Haukeland Universitetssjukehus

E-post: oivind.kommedal@helse-bergen.no

Kvalitet i det daglige handler om håndtering av avvik som oppstår etter at en analyse er ferdig validert og implementert. Videre handler det om hvordan enkeltsvar kvalitetssikres og tolkes. Sist, men ikke minst, handler det om hvor raskt rekvirenten får svar.

De vanligste problemene i PCR-oppsett er positive kontroller som faller utenfor referansegrensene, atypiske kurver og såkalte «skitupper», det vil si kurver som begynner å stige helt på slutten av kjøringen. Første ledd i en feilsøking er som oftest en omkjøring. En kontroll som ikke går inn eller mange prøver med skitupper eller atypiske amplifikasjonskurver krever som oftest at hele oppsettet kjøres på nytt. For problematiske enkeltkurver holder det som oftest å reanalysere den prøven det gjelder. Dersom hele oppsettet må kjøres på nytt må man sjekke om det er tatt i bruk en ny lot av et eller flere reagenser/-kontroller og om det i så fall er aktuelt med parallelloppsett med gammel/ny lot.

Risikoen for amplikon-forurensing, det vil si at utstyr og reagenser kontamineres med amplikon fra tidligere PCR-kjøringer, er betydelig redusert med innføring av real-time PCR og reduksjon av behovet for å utføre viderearbeid med oppkopierte DNA. Risikoen er likevel ikke eliminert, og bruk av fysisk adskilte rom for tillaging av mastermiks, tilsetting av templat og amplifikasjon av PCR er sunne prinsipper som må ivaretas. I de tilfellene der viderearbeid som gelkjøring eller sekvensering er nødvendig, må dette utføres på et eget post-PCR rom av godt opplært personale og med dedikert utstyr som ikke brukes andre steder.

Robotisering og parallell prosessering av mange prøver samtidig representerer ofte en kvalitetsheving. Likevel er det, som følge av teknisk svikt, brukerfeil eller dårlig design en risiko for krysskontaminering både under ekstraksjon og PCR. Generelt gjelder for både automatiserte og manuelle metoder at massiv forurensing er lett å oppdage ved at den negative kontrollen/hele oppsettet blir positivt. Sporadisk eller lavgradig forurensing kan være meget vanskelig å oppdage, og krever årvåkenhet av både bioingeniører og leger. Tegn på forurensing kan være mange svakt positive prøver, en plutselig økning av forekomst, eller dårlig korrelasjon mellom positivt resultat og klinikk. Ved mistanke om forurensing er ofte første tiltak å sette på et helt oppsett med sikkert negative prøver og deretter eventuelt kjøre med økt antall negative kontroller en periode. Når feil oppstår er det viktig å ta stilling til om feilen er av en slik karakter at ingen svar bør gis ut, eller om noen prøver likevel kan besvares med rimelig sikkerhet. Disse vurderingene avhenger av når prøvene kan reanalyseres og hvilken type prøvemateriale/problemstilling det er snakk om. For pasienter med akutte infeksjonstilstander representerer forlenget svartid en vesentlig reduksjon i diagnostisk kvalitet. Dersom lot-kontroll og omkjøring ikke løser problemet må det umiddelbart legges en plan for videre feilsøking og for hvordan de aktuelle prøvene skal håndteres i mellomtiden.

Mange laboratorier har PCR-analyser uten amplifikasjonskontroll.

Amplifikasjonskontrollen er helt nødvendig for å oppdage inhibisjon, men også for å kontrollere at alle nødvendige reagenser er tilsatt i den aktuelle reaksjonsbrønnen. Dette gjelder ikke minst prøver som pipetteres med robot. Amplifikasjonskontrollen bør tilsettes luseringsbuffer/ekstraksjonsmiks og gå gjennom ekstraksjonstrinnet. Hvis ikke er man sårbar for falskt negative prøvesvar som følge av egenskaper ved prøvemateriale eller transportmedium som kan redusere utbyttet av DNA-ekstraksjonen. Dette kan blant

annet være variasjoner i pH eller saltkonsentrasjoner og vil særlig gjelde analyser som kjøres i en rekke ulike prøvematerialer eller dersom en mottar prøver fra andre laboratorier som benytter andre transportmedier. Ved ekstraksjon fra cellefattig materiale som for eksempel spinalvæsker eller skyllevæsker fra luftveiene kan det være nødvendig å tilsette en såkalt «carrier» for å redusere uspesifikk binding av mål-DNA/RNA til plast og sikre at det meste kommer gjennom ekstraksjonen. Carrier kan bestå av f.eks. kommersielt poly-A, plasma eller transportmedium. Det bør være et mål at alle nye analyser som innføres har en adekvat amplifikasjonskontroll, og at man på sikt også innfører dette på eldre analyser der dette mangler.

Tolking av PCR-kurver er i utgangspunktet uproblematisk. I praksis ser vi imidlertid ofte kurve-fenomener som kan være vanskelige å tolke og at den automatiske tolkningen som utføres av PCR-instrumentet kan være tvilsom. Det kan være ulik oppfatning blant både bioingeniører og leger om hva som er en sikker og hva som er en tvilsom kurvefortolkning og laboratoriene har ulik praksis i forhold til om kurver skal vurderes av en eller flere personer. Det er viktig å ha en lav terskel for når en kurve skal diskuteres med fagansvarlig bioingeniør og/eller lege.

En annen potensiell feilkilde er overføring av svar fra PCR-instrument til laboratoriets datasystem. Dersom dette gjøres manuelt er det en ikke neglisjerbar mulighet for tastefeil, spesielt på større oppsett med mange positive prøver. Laboratoriene har ulik praksis for i hvilken grad innlegging av svar kvalitetssikres.

Laboratoriene har ulik praksis for bruk av cut-off for PCR. Noen opererer med en gråsoner etter en gitt Ct-verdi, der positive PCR-kurver etter denne oppfattes som usikre. Andre begrenser antallet sykluser de kjører og aksepterer alle positive kurver. Mange har ikke tatt aktiv stilling til denne problemstillingen i det hele tatt, i alle fall ikke for alle sine PCR-analyser.

For alle analyser med behandlingsmessige konsekvenser bør laboratoriet sette seg et mål om ønsket analysetid. Den faktiske analysetiden bør kontrolleres jevnlig, og forbedringstiltak innføres dersom den er lengre enn det som er ønskelig (eventuelt mulig).

Deltakerliste

Strategimøte i virologi 26. oktober 2017 - Kvalitetskontroll av genteknologiske metoder

Foredragsholdere og møteledere				
Øyvind	Kommedal	Helse Bergen	oyvind.kommedal@helse-bergen.no	innleder/ møteleder
Fredrik	Müller	Oslo universitetssykehus	fmuller@ous-hf.no	innleder/ møteleder
Gro	Njølstad	Helse Bergen	gro.njolsatd@helse-bergen.no	innleder
Andreas	Christensen	St. Olavs Hospital	Andreas.Christensen@stolav.no	innleder
Kåre	Bergh	St. Olavs Hospital	kare.bergh@stolav.no	innleder
Amir	Moghaddam	Fürst Medisinsk Laboratorium	amoghaddam@furst.no	innleder
Garth	Tylden	Universitetssykehuset Nord-Norge	garth.tylden@unn.no	innleder
Rikard	Rykkvin	Folkehelseinstituttet	rikard.rykkvin@fhi.no	innleder
Karoline	Bragstad	Folkehelseinstituttet	karoline.bragstgad@fhi.no	innleder
Øvrige deltakere				
Anders	Bredberg	Sykehuset Innlandet - Lillehammer	anders.bredberg@sykehuset-innlandet.no	representant
Andreas	Emmert	Sykehuset Østfold	Andreas.Emmert@so-hf.no	representant
Angela	Kümmel	Sykehuset Levanger	Angela.Kummel@helse-nordtrondelag.no	representant
Anita	Kanestrøm	Folkehelseinstituttet	anita.kanestrom@fhi.no	observatør
Annette	Onken	Bærum sykehus, Vestre Viken	annette.onken@vestreviken.no	representant
Astri Lervik	Larsen	Akershus universitetssykehus	Astri.Lervik.Larsen@ahus.no	observatør
Carina	Thilesen	Unilabs Laboratoriemedisin	carina.thilesen@unilabs.com	representant
Dagny Haug	Dorenberg	Folkehelseinstituttet	DagnyHaug.Dorenberg@fhi.no	arbeidsgruppen for møtet
Einar	Nilsen	Helse Møre og Romsdal. Molde/Ålesund	einar.nilsen@helse-mr.no	representant
Elisebet	Haarr	Stavanger universitetssjukehus	hael@sus.no	observatør
Ellen Kristine	Holter	OUS Rikshospitalet	eholter@ous-hf.no	representant
Guro Helen Furset	Jensen	Sørlandet sykehus - Kristiansand	gurjen@ous-hf.no	observatør
Hans-Johnny Schjelderup	Nilsen	St. Olavs Hospital	Hans-Johnny.Schjelderup.Nilsen@stolav.no	
Heidi Cecilie	Villmones	Sykehuset i Vestfold	heivil@siv.no	representant
Inger Sofie	Samdal-Vik	Folkehelseinstituttet	Inger.Sofie.Samdsal.Vik@fhi.no	
Irene Beate	Olsøy	Universitetssykehuset Nord-Norge	irene.beate.olsoy@unn.no	representant
Janne	Møller-Stray	Drammen sykehus	JMOELL@vestreviken.no	observatør

Kathrine	Stene-Johansen	Folkehelseinstituttet	Kathrine.Stene-Johansen@fhi.no	
Kirsten Irene Ege	Bygdås	Folkehelseinstituttet	kirsten.bygdas@fhi.no	medlem av referansegruppen
Kristin	Modalsli	Folkehelseinstituttet	kristin.rasmussen.modalsli@fhi.no	andre
Liv Jorunn	Sønsteby	Haugesund sjukehus	liv-jorunn.sonsteby@helse-fonna.no	representant
Monica R.	Romstad	Stavanger universitetssjukehus	monica.regine.romstad@sus.no	representant
Nadine	Pullar	Bærum Sykehus, Vestre Viken	NADPUL@vestreviken.no	observatør
Nina	Egeberg	Unilabs laboratoriemedisin AS	nina.egeberg@unilabs.com	observatør
Olav	Hungnes	Folkehelseinstituttet	olav.hungnes@fhi.no	representant
Peter	Gaustad	Fürst medisinsk laboratorium	pgaustad@furst.no	representant
Regine	Barlinn	Folkehelseinstituttet	regine.barlinn@fhi.no	medlem av referansegruppen
Roar Magne	Bævre-Jensen	Drammen sykehus	Roar.Baevre-Jensen@vestreviken.no	representant
Sandra	Åsheim	Nordlandssykehuset i Bodø	sandra.asheim@nlsh.no	representant
Siri	Feruglio	Folkehelseinstituttet	siri.laura.feruglio@fhi.no	observatør
Susanne Gjeruldsen	Dudman	Folkehelseinstituttet	susanne.gjeruldsen.dudman@fhi.no	arbeidsgruppen for møtet
Sølvi	Nordaas	Sørlandet sykehus - Kristiansand	solvi.noraas@sshf.no	representant
Truls Michael	Leegaard	Akershus universitetssykehus	Truls.Michael.Leegaard@ahus.no	representant
Unn	Houge	Sørlandet sykehus - Kristiansand	unn.houge@sshf.no	medlem av referansegruppen
Veselka Petrova Dimova	Svetoslavova	Oslo universitetssykehus - Ullevål	vesdim@ous-hf.no	representant
Åshild	Marvik-Rødland	Sykehuset i Vestfold	ashildma@gmail.com	observatør

Utgitt av Folkehelseinstituttet
September 2018
Postboks 4404 Nydalen
NO-0403 Oslo
Telefon: 21 07 70 00
Rapporten kan lastes ned gratis fra
Folkehelseinstituttets nettsider www.fhi.no