

Kvalitativa undersökningar – uppskattning och kontroll av osäkerhet inom Laboratoriemedicin

Inledning

Kvalitativa undersökningar definieras som undersökningar där svaret antingen identifierar en komponent eller anger om en viss komponent kunnat påvisas (klassning). I det senare fallet är svaret binärt (det uttrycks i formen ja/nej, positivt/negativt etc.). Svarets utformning skiljer sig således mellan kvalitativa undersökningar och kvantitativa - för de senare anges svaret som ett numeriskt värde.

Enligt SS-EN ISO/IEC 17025 och SS-EN ISO 15189 [1,2] skall mätosäkerhet anges för ackrediterade kvantitativa undersökningar. Mätosäkerhet för "kvantitativa undersökningar" behandlas i SWEDAC DOC 05:03 [3].

Föreliggande dokument beskriver hur osäkerheten hos kvalitativa undersökningar kan uppskattas och kontrolleras samt hur den skall anges för beställarna.

Metoderna för att utvärdera och säkerställa kvalitet är inte lika väl etablerade för kvalitativa undersökningar som för kvantitativa och ofta saknas samstämmighet om terminologin. Detta dokument har utgått från arbetet "Quality assurance of qualitative analysis in the framework of the European project 'MEQUALAN' " [4], i vilket implementering av kvalitetsbegrepp i kvalitativa undersökningar diskuteras.

I detta dokument används ordet "osäkerhet" som en svensk motsvarighet till det engelska "unreliability". Termen osäkerhet kommer således att ha motsvarande funktion för kvalitativa metoderna som begreppet mätosäkerhet för de kvantitativa – även om termerna inte är direkt jämförbara.

Olika typer av kvalitativa undersökningar

De kvalitativa undersökningarna kan indelas i olika typer. De två huvudgrupperna är identifiering och klassning. Klassning kan sedan i sin tur indelas i undergrupper. Observera dock att gränserna mellan olika typer ibland är flytande. Det gäller både mellan olika typer av kvalitativa undersökningar och mellan kvalitativa och kvantitativa undersökningar.

Exempel på olika typer av kvalitativa undersökningar ges i bilaga 1.

På grund av specialitetsberoende olikheter beskrivs patologiska/cytologiska undersökningar separat

Uppskattning av kvalitativa undersökningars osäkerhet

Beskrivningen av en kvalitativ undersöknings osäkerhet skall ge beställaren ett underlag för att adekvat kunna tolka resultatet i relation till patientens kliniska symptom. Uppgifter om resultatets osäkerhet skall möjliggöra en jämförelse av resultat mellan olika undersökningstillfällen, mellan olika undersökningsmetoder och mellan olika laboratorier.

Då osäkerheten för kvalitativa undersökningar oftast inte kan anges med en siffra får man istället använda flera olika uttryck parallellt för att beskriva osäkerheten.

I SWEDAC DOC 01:55, Validering/verifiering av kvantitativa och kvalitativa metoder [5], definieras ett antal begrepp som beskriver en metods osäkerhet. Flera av dessa är tillämpliga för kvalitativa metoder. Osäkerheten påverkas också av ett flertal preanalytiska faktorer som kan vara svåra att uppskatta (se bilaga1) men icke desto mindre bör anges om de är av betydelse.

En undersöknings osäkerhet är beroende av den använda undersökningsmetodens prestanda. Ett sätt att uppskatta osäkerheten är därför att jämföra använd metod med en internationell eller nationell referensmetod genom validering. Smittskyddsinstitutet ger i samarbete med Föreningen för medicinsk mikrobiologi ut en serie "Referensmetodik för laboratoriediagnostik vid kliniskt mikrobiologiska laboratorier; I. Infektionsdiagnostik". Nedan kommenteras några av de viktigaste begreppen som beskriver osäkerheten för kvalitativa metoder baserade på identifiering respektive på klassning.

Identifiering

Metoder som bygger på identifiering av en komponent, exempelvis typning av bakterier, morfologisk bedömning, mönsterjämförelse och sekvensering inrymmer osäkerhetsmoment både vid det subjektiva igenkännandet av ett mönster och vid tolkningen av detta när det relateras till kända och accepterade mönster i olika jämförelsebibliotek. Osäkerheten beror därför på avläsarens erfarenhet men också på jämförelsematerialets kvalitet och den metod som används.

Klassning

Sensitivitet och specificitet är två begrepp som används för att beskriva en metods användbarhet för diagnostik. Andra viktiga mått på en metods osäkerhet är de positiva och negativa prediktiva värdena. Dessa senare mått är avhängiga av en sjukdoms prevalens. Vid en hög prevalens ger en lägre specificitet hos en undersökningsmetod ett högre positivt prediktivt värde än vid en låg prevalens. Är prevalensen låg krävs däremot en mycket hög specificitet för att ett positivt resultat skall vara sant positivt. Det omvända förhållandet gäller för det negativa prediktiva värdet.

Osäkerheten i kvalitativa undersökningar är också beroende av hur säkert man kan fastställa en metods referensområde och cut-off samt metodens detektionsnivå. Uppgift om metodens detektionsnivå är därför ett annat viktigt mått för att kunna bedöma ett positivt respektive negativt resultats osäkerhet.

Inom patologi/cytologi föreligger särskilda omständigheter som motiverar att detta område bedöms separat, se bilaga 1.

Kontroll och uppföljning av kvalitativa undersökningars osäkerhet

För att säkerställa god kvalitet krävs att kvalitativa undersökningar är validerade och/eller verifierade samt har interna och externa kontrollprogram. Riktlinjer för detta finns utarbetade i SWEDAC DOC [5,6].

När det gäller interna kontroller för kvalitativa undersökningar bör - utöver vad som nämns i SWEDACDOC 01:31 Interna kontroller [6], - även följande beaktas:

- För metoder som bygger på identifiering krävs positiv och negativ kontroll. Vidare skall ev. apparatur - som fotometrar och annan analysapparatur - kontrolleras regelbundet och värden på olika mätparametrar dokumenteras.
- För klassningsmetoder som bygger på jämförelse av ett mätvärde med en förvald cut-off, skall man använda såväl en negativ som en positiv kontroll. Den positiva kontrollen används som en driftkontroll och bör ligga strax ovanför cut-off-gränsen för att säkerställa kvaliteten inom detta område. Den skall relateras till värdet för cut-off, t ex genom att beräkna kvoten för driftkontrollens mätvärde och cut-off-värdet. Kvoten bör följas i ett diagram och gränser för tillåten variation av den skall fastställas.
- Vid titreringar bör man använda en driftkontroll, vars tillåtna variation vanligen sätts till högst +1 spädningsteg. För att säkert kunna avgöra variationens storlek rekommenderas att driftkontrollen används i 4 titersteg, där spädningarna har valts så att utfallet vanligen bli den näst lägsta spädningen. Detta innebär att man kan utesluta att variationen är större än ett spädningsteg.

För att minska betydelsen av interassay-variationen kan vid behov ytterligare säkerhet ibedömningen uppnås om titreringen av tidigare prov upprepas tillsammans med titrering av det nya provet.

Inom patologi/cytologi utarbetas på nationell nivå, inom ramen för kvalitets- och standardiseringsarbetet, rekommendationer för varje ackrediterad metod hur undersökningen utförs och osäkerheten anges.

Angivande av osäkerhet till beställare

Osäkerheten för kvalitativa undersökningar kan således inte anges med ett siffervärde för mätosäkerheten på det sätt som görs för kvantitativa metoder - i stället får andra uppgifter användas.

Laboratoriet skall fastställa vilka faktorer som påverkar undersökningens osäkerhet i väsentlig grad. Preanalytiska faktorer som är av betydelse skall alltid tydligt anges i provtagningsanvisningen.

För identifieringsmetoder bör uppgifter om standard, jämförelsebibliotek och jämförelsemetod, teknik för kalibrering av apparatur samt referensmetoder finnas tillgängliga. Dessa skall lämnas till beställaren vid förfrågan.

För klassningsmetoder dokumenteras och tillhandahålls på motsvarande sätt uppgifter om standard, val av cut-off-gräns, tillåten variation av internkontroller samt referensmetod. Uppgifter om sensitivitet och specificitet samt positivt och negativt prediktivt värde bör anges i den mån sådana kan tas fram.

Referenser:

1. SS-EN ISO/IEC 17025, Allmänna kompetenskrav för provnings- och kalibreringslaboratorier, SIS, Stockholm, 2018
2. SS-EN ISO 15189, Kliniska laboratorier - Särskilda krav på kvalitet och kompetens, SIS, Stockholm, 2022
3. SWEDAC DOC 05:03, Mätosäkerhet och jämförelse av resultat mellan metoder/instrument inom laboratoriemedicin
4. Ríos et al. Quality assurance of qualitative analysis in the framework of the European project
5. Mequalan'. Accred Qual Assur 2003; 8:68-77
6. SWEDAC DOC 01:55, Validering/verifiering av kvantitativa och kvalitativa metoder
7. SWEDAC DOC 01:31, Interna och externa kontroller
8. Referensmetodik för laboratoriediagnostik vid kliniskt mikrobiologiska laboratorier. I 1 - 11.
9. Ellison SLR ET AL. Characterising the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology. Trans in Analytical Chemistry 2005:24:468.

Bilaga 1 – Definition av och exempel på olika typer av kvalitativa undersökningar och preanalytiska faktorer

1. Undersökningar inom de kliniska specialiteterna Bakteriologi, Farmakologi, Immunologi, Kemi, Parasitologi, Transfusionsmedicin och Virologi

1. **Identifiering.** Identifiering av exempelvis ett kemiskt ämne, en bakteriestam, ett blodgruppsantigen eller en specificitet för en antikropp. Det viktiga är identifieringen utan hänsyn till ämnets koncentration.
2. **Klassning (förekomst eller avsaknad av ett ämne).** Även om resultatet vid denna typ av undersökningar anges binärt är gränsdragningen mot kvantitativa metoder inte knivskarp. Många gånger erhålles även vid kvalitativa metoder först ett mätvärde, som sedan ligger till grund för klassningen.
 - a. **Teststickor eller "plus/minus-tester".** Denna typ av undersökningar ger inte något mätvärde utan resultatet bedöms utifrån ett färgomslag eller liknande. Känsligheten är satt så att ett "positivt" utfall motsvarar en koncentration, som är kliniskt viktig. Även dessa metoder bygger dock ofta på mätvärdesbaserade kvantitativa metoder, eftersom sådana kan användas för att ställa in lämplig sensitivitet och specificitet, när man utvecklar ett kit.
 - b. **"Cut-off-undersökningar".** Bestämning om ett prov ligger över en viss gräns (cut-off). Undersökningarna ligger nära de kvantitativa, eftersom de primärt ger ett mätvärde. Detta mätvärde jämförs sedan med ett förutbestämt (eller kalkylerat) gränsvärde (cut-off) för att avgöra om utfallet av undersökningen är positivt eller negativt.
 - c. **Semi-kvantitativa undersökningar.** Exempel på detta är undersökningar, där man bestämmer ett intervall eller en titer. Dessa undersökningar är egentligen kvantitativa till sin natur, men resultatet ligger inte på en kontinuerlig skala. Därför är det svårt att använda de formler för beräkning av mätosäkerheten, som används för de egentliga kvantitativa metoderna.

I tabell 1 ges exempel på olika kvalitativa undersökningar inom några av de ovan nämnda specialiteterna.

Tabell 1 - Exempel på indelning av kvalitativa undersökningar inom bakteriologi, immunologi, parasitologi, transfusionsmedicin och virologi

Typ av undersökning	Identifiering: (CPE, typning, sekvensering)	Klassning: Test- stickor eller "plus/ minus-tester"	Klassning: "Cut-off- undersökningar" (baserat på dataanalys)	Klassning: Semi- kvantitativa undersökningar
Bakteriologi	- Fecesodling - Salmonella - Shigella - Yersinia - Campylobacter	Pneumokock-antigen i urin	PCR Chlamydia trachomatis	- Urinodling - Serologi: ELISA Komplement- bindning(titrering)
Immunologi	HLA-typning	Påvisande av kryoglobulin Korstest inför transplantation	Screeningtester med ELISA	Titrering av autoantikroppar
Parasitologi	Feces- mikroskopi	Malaria-test	–	–
Transfusionsmedicin	Blodgruppering	Mottagar-givartest	–	Titrering av ery- trocytantikroppar
Virologi	Virusodling	- Antigentester: Influensa, RSV - Antikroppstester: Heterofila antikroppar	- Antigen/antikropp tester: Hepatit/HIV - PCR: Norovirus CMV	Serologi: ELISA Komplement- bindning (titrering)

2. Undersökningar inom patologi/cytologi

Morfologisk diagnostik baseras på flera parallellt förlöpande bedömningar. En sådan är att fastställa vävnads- och celltyp men också typ av biologisk process. En annan är att gradera avvikelser i förhållande till normalbilden och att kvantifiera/skatta fynd såsom t ex positivt utfall i olika färgningar, gradera cellinfiltration och förekomst av vissa strukturer eller celler. Ofta sammanställs flera bedömningar till en sammanfattande klassificering enligt ett överenskommet system.

Tabellen nedan sammanfattar olika bedömningar inom patologi och cytologi där även kvantifieringar ingår.

Tabell 2 - Exempel på olika bedömningar inom patologi och cytologi

Typning: Tillämpning av komplext kriteriesystem	Gradering: Univariabel	Gradering: Multivariabel"	Kvantifiering: Anges i fortlöpande numerisk skala eller som %
<ul style="list-style-type: none"> • Vävnadstypning i histologiska snitt • Celltypning i vävnader och cytologiskt material • Processtypning/tolkning i vävnads- eller cell-material med sjukliga förändringar såsom inflammation, atrofi eller neoplasi • WHO-klassificering av tumörtyper • TNM-klassificering 	<ul style="list-style-type: none"> • Grad av inflammation • Fibros vid kronisk hepatit • Bakteriemängd vid gast 	<ul style="list-style-type: none"> • Dysplasi-gradering i vävnads- eller cellprov • Malignitetsgrad enl Nottingham • Gleason-gradering av prostatacancer 	<ul style="list-style-type: none"> • Hormonreceptorer i IH-snitt • Intraepiteliala lymfocyter • Differentialräkning av benmärgsprov (= både kvantifiering och typning) • Mitoser/HPF • LAP-score

Kommentar: Vid kvantifieringar bör man, i de fall de starkt påverkar behandling, ange hur bedömningen utförts (t ex antal celler eller räknade synfält där den aktuella synfältsdiametern anges) och metodens osäkerhet. Vid typning, graderingar bör man i varje enskilt fall kommentera om det föreligger särskilda bedömningssvårigheter och därmed osäkerhet i bedömningen (vid gränsfall, dålig fixering, sparsamt material).

3. Preanalytiska faktorer och deras betydelse

De preanalytiska faktorer som har betydelse för provresultatet, kan grovt grupperas in i faktorer enligt följande:

Patient och patientförberedelse

Patientens identitet skall säkerställas.

Vissa undersökningar ställer särskilda krav på förberedelse av patienten, som t ex blåsinkubationstid vid urinodling, fasta inför vissa undersökningar eller provtagning vid givna tidsintervall.

Provtagning och remissuppgifter

Provmaterial, provtagningsteknik och provmängd skall vara adekvat för undersökningen. Provet skall vara korrekt märkt och uppgifterna skall överensstämma med remissen. Inom patologin är det viktigt att provtagningsställe anges och att det vid behov genom lämplig märkning går att orientera preparatet. Tidpunkt för provtagningen, förvaringstemperatur och eventuell fixering eller annan hantering skall anges där det har betydelse. Detsamma gäller viktiga anamnestiska uppgifter, av vilka vissa utgör obligatorisk information för att utföra en undersökning (nyligen erhållen blodtransfusion, graviditet, pågående behandling, utlandsvistelse, insjukningsdag m.m.).

Provhantering, transport och provmottagning

Transporttid, temperatur och val av transportmedium kan ha avgörande betydelse för provets kvalitet och undersökningen, liksom det omedelbara omhändertagandet på laboratoriet. När provet kommer till laboratoriet måste uppackning och omhändertagande vara korrekta med rätt tolkning av frågeställning och kodning. Provet måste även förberedas korrekt inför undersökningen (centrifugering, utskärning, vägning, mätning, markering m.m.).

Sammanfattningsvis är det svårt att ange ett mått på betydelsen av de preanalytiska faktorerna. Laboratoriet skall dock fastställa om några faktorer är kritiska för slutresultatet och informera beställaren om dessa. Laboratoriet skall sedan i sitt kvalitetsarbete medverka till att variation på grund av dessa faktorer minimeras. I svaret skall anges om det finns kritiska preanalytiska faktorer som är bristfälliga.



Besöksadress: Österlånggatan 9, 503 31 Borås
Postadress: Box 878, 501 15 Borås



0771-99 09 00



registrator@swedac.se



www.swedac.se