

Cecilie Johanne Liland Kjellevold
Dalila Valenzuela

Nytt EU-regulativ for in vitro diagnostisk utstyr. Konsekvenser for St. Olavs hospitals Enhet for immunhistokjemi

Bacheloroppgave i Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Randi Anny Utne Holt og Lise Wålberg

Mai 2020

Cecilie Johanne Liland Kjellevold
Dalila Valenzuela

**Nytt EU-regulativ for in vitro
diagnostisk utstyr.
Konsekvenser for St. Olavs hospitals
Enhet for immunhistokjemi**

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Randi Anny Utne Holt og Lise Wålberg
Mai 2020

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden

FORORD

Denne rapporten er skrevet i forbindelse med HBIO 3001- Bacheloroppgave i bioingeniørfag, som er en del av bioingeniørutdannelsen ved NTNU. Takk til alle våre lærere som har gitt oss kunnskapen som kreves for å kunne gjennomføre denne utdanningen.

Takk til våre veiledere Førsteamanuensis ved Institutt for bioingeniørfag Randi Anny Utne Holt, og Spesialbioingeniør ved Avdeling for patologi Lise Eid Wålberg som har gitt oss konstruktiv tilbakemelding og hjelp med en oppgave som ble annerledes enn det vi alle hadde sett for oss. Takk for at dere tok dere tid til å svare på alle våre spørsmål og veilede oss hele veien. Vi ønsker også å takke Avdeling Patologi – Enhet for immunhistokjemi som har gitt oss et digitalt innsyn i den spennende hverdagen til de ansatte som utfører immunanalyser der.

Trondheim 20.05.2020

Dalila Valenzuela

Cecilie J. L. Kjellevold

SAMMENDRAG

Norge samarbeider med EU (Den Europeiske Union) gjennom EØS avtalen. Denne avtalen gir Norge tilgang til markedet i EU, men samtidig også plikt til å følge direktiver og regulativer satt frem av EU.

Medisinske laboratorier i Norge benytter in vitro medisinsk utstyr (IVMU) til diagnostikk. EU direktiv 98/79/EC har vært det gjeldende regelverket for bruk og produksjon av IVMU. Direktivet inneholder retningslinjer for hvordan IVMU skal brukes og produseres, men hvordan disse retningslinjer følges har vært opp til hvert medlemsland. Siden bruk av IVMU kan ha direkte konsekvenser for diagnostikk og behandling av pasienter, ble det bestemt å innføre strengere regelverk. Derfor har EU vedtatt et regulativ som erstatter direktivet.

Dette nye regulativet kalles Europaparlamentet og Rådets Forordning (EU) nr. 2017/746 om in vitro diagnostisk medisinsk utstyr (IVDR) og trådte i kraft 25. Mai 2017. Det er en overgangsperiode på 5 år som gir alle berørte parter tid til å legge om sin praksis slik at de er i henhold til de nye reglene. IVDR inneholder strengere retningslinjer når det gjelder produksjon, risikovurdering og sporbarhet av IVMU. Innholdet i regulativet er hovedsakelig rettet mot produsenter av utstyr som produseres i industriell skala. Men det har også regler som gjelder for helseinstitusjoner som bruker og modifierer IVMU. Dersom utstyr brukes slik det er tiltenkt av produsenten, vil bruken av IVMU ikke påvirkes av de nye reglene. Men dersom IVMU modifieres er det nødvendig å vurdere om bruken fortsatt er i henhold til IVDR.

Medisinske laboratorier som benytter IVMU i sine analyser påvirkes av IVDR. For å eksemplifisere dette tar denne rapporten utgangspunkt i analyser hos Enhet for immunhistokjemi ved Avdeling for patologi, St. Olavs hospital. I disse analysene brukes det antistoff til å finne markører i vevsprøver fra pasienter. Det er en del utfordringer med immunhistokjemiske metoder som fører til at disse antistoffene brukes på en annen måte enn det som er tiltenkt av produsenten, dette for å oppnå bedre resultater. Det tidligere direktivet la ikke føringer for denne modifierede bruken av utstyr, men IVDR er strengere og inneholder krav som påvirker denne praksisen. Hensikten med denne rapporten er å finne ut om enheten kan fortsette å bruke og modifierer IVMU som de gjør i dag, eller om de må forandre praksisen på grunn av innføring av IVDR.

ABSTRACT

Norway is associated with the European Union through its membership in agreements in the European Economic Area (EEA). These agreements give Norway access to the European market, but also gives Norway the responsibility to follow the directives and regulations put forward by the EU.

Medical laboratories in Norway use in vitro medical devices (IVMD) for diagnostic purposes. How these devices are produced and taken into service has been governed by EU directive 98/79/EC. This directive contains guidelines for use and production of IVMD, but the way in which these guidelines are followed is up to each member state. Because use of these devices can have direct consequences for treatment and diagnosis of patients, there is need for stricter guidelines governing the use of them. Therefore, it has been decided by the EU to change the directive that is in place today to a stricter regulation.

This new Regulation (EU) 2017/ 47 on in vitro diagnostic medical devices (IVDR) came into effect May 25th 2017 and has a transitional period of five years to allow those affected by the regulation time to change their practices such as they are in accordance to the new guidelines. The IVDR will have stricter guidelines when it comes to production of IVMD, classification of risk associated with use of these devices, and better traceability of these. Most of what is stated in the IVDR concerns manufactures which produce IVMD on an industrial scale, but there are exceptions which are relevant for use and modification of IVMD within health institutions. If a medical device is used as the manufacturer intends it to be used, its use will not be affected by the IVDR. But if there is a modification done to a device, it is necessary to review if use of the device is in accordance with the IVDR.

All medical laboratories which use IVMD in their analyses will be affected by the new regulation. As an example of how laboratories will be affected, this report will look closer at different analyses conducted at the Division for Immunohistochemistry within the Department of Pathology at St. Olavs hospital. This division uses antibodies to find markers, most associated with cancer, in patient tissue. Because analyses within immunohistochemistry have special challenges associated with them, it is such that the laboratory must modify use of devices from

their intended purposes recommended by manufacturers of IVMD in order to achieve optimal results. Modification of IVMD was not an issue under the directive, but this practice will now be affected under the stricter guidelines of the IVDR. It is the aim of this report to find out how this practice will be affected, and if the department can continue using IVMD the way they do today.

FORKORTELSER

I denne rapporten er det brukt noen forkortelser, disse er samlet i Tabell i.

Tabell i – Forkortelser brukt i rapporten

Forkortelse	Betydning
AP	Avdeling for patologi
CC1	Cell Conditioning 1
CE	European Conformity / den Europeiske samsvarskomiteen
EEA	European Economic Area
EF	De europeiske fellesskapene – erstattet av EU
EQS	Extended Quality System
ER	Østrogen reseptor
EU	Den Europeiske Union / Europaparlaments- og rådsforordning
EUDAMED	European Database on medical devices
EØS	Det europeiske økonomiske samarbeids område
FISH	Fluorescens in situ hybridisering
GI	Gastrointestinal
HE	Hematoxylin Eosin
HER2	Human epidermal vekstfaktor
HIER	Heat Induced Epitope Retrieval / epitopgjenoppretting
HRP	Horserraddish peroksidase
IHC	Immunhistokjemi
IMRoD	Innledning, Material og metode, Resultat og Diskusjon
IVDR	EU regulativ nr. 2017/746 av 5. april 2017 om in- vitro diagnostisk medisinsk utstyr
IVMD	In- vitro medical devices
IVMU	In vitro medisinsk utstyr
LMK	Laboratoriemedisinsk klinikk
MTb	Multivevsblokk

NordiQC	Nordic Immunohistochemical Quality Control
NTNU	Norges teknisk-naturvitenskapelig universitetet
PGR	Progesteron reseptor
RTU	Ready to use / Klar til bruk
UDI	Unique Device Identification

Innholdsfortegnelse

1. INNLEDNING	1
1.1. HENSIKT MED RAPPORTEN	1
1.2. TEORI.....	3
1.2.1. EU-direktiv og -regulativ.....	3
1.2.2. Oppbygning og innholdet i IVDR.....	3
1.2.3. Sporbarhet, klassifikasjon og CE-merking.....	4
1.2.4. Histopatologi og immunhistokjemisk metode (IHC).....	6
1.2.5. Utfordringer innen IHC.....	9
1.2.6. IHC ved Enhet for immunhistokjemi.....	10
1.2.7. Kvalitetskontroll ved avdeling for patologi og Enhet for immunhistokjemi.....	13
2. MATERIALE & METODE.....	15
2.1. METODE.....	15
2.1.1. Kvalitativ metode og bias.....	15
2.1.2. Metode i denne rapporten.....	15
2.1.3. Gjennomføring	16
2.2. MATERIAL.....	17
2.2.1. Valideringsplan og -rapporter.....	17
2.2.2. Reagensvedlegg.....	18
2.2.3. Antistoff.....	18
2.2.4. NordiQC (Nordic Immunohistochemical Quality Control)	23
2.2.5. EQS (Extended Quality System)	23
2.2.6. Andre kilder	24
3. RESULTATER	25
3.1. IVDR – TOLKNING AV UTKLIPP FRA REGULATIVET	25
3.1.1. IVDR – Introduksjon, Punkt 29.....	25
3.1.2. IVDR – Artikkel 1.....	26
3.1.3. IVDR – Artikkel 2.....	26
3.1.4. IVDR – Artikkel 5.....	28
3.2. ANTISTOFF	33
3.2.1. Eksempel 1: CD163	33
3.2.2. Eksempel 2: CDX-2	35
3.2.3. Eksempel 3: H3G34W	37

3.2.4.	<i>Eksempel 4: PAX5</i>	39
3.2.5.	<i>Eksempel 5: WT1</i>	40
3.2.6.	<i>Eksempel 6: ROS1</i>	42
4.	DISKUSJON	45
4.1.	BEGRENSNINGER.....	45
4.2.	GENERELLE ANBEFALINGER.....	46
4.3.	GJENNOMGANG OG ANBEFALINGER TIL EKSEMPLENE	47
4.4.	VALIDERINGSRAPPORTER	52
4.5.	KONTROLLMATERIAL.....	54
5.	KONKLUSJON	55
6.	REFERANSER	57
7.	VEDLEGG A	1
8.	VEDLEGG B	4

1. INNLEDNING

1.1. Hensikt med rapporten

Den europeiske union (EU) vedtok 5.april 2017 en ny juridisk bestemmelse som gjelder for alle medisinske laboratorier i Norge. Gjennom EØS-avtalen (Det europeiske økonomiske samarbeidsområde) er Norge forpliktet til å følge regelverk som vedtas av EU. Dette gjelder også det nye regulativet, forordning (EU) 2017/746 om in vitro diagnostisk medisinsk utstyr (*In-vitro-diagnostisk medisinsk utstyr - regjeringen.no*, 26.03.2020). Dette regulativet omtales heretter som *IVDR* eller *regulativet*. IVDR erstatter dagens direktiv 98/79/EF og kommisjonsvedtak 2010/227/EU.

Denne bacheloroppgaven er gitt av Enhet for immunhistokjemi (heretter også referert til som *enheten*) ved Avdeling for patologi ved St. Olavs hospital. Oppgaven har som hensikt å identifisere og diskutere konsekvenser som følge av at det juridiske regelverket for medisinske laboratorier endres fra et direktiv til et regulativ. IVDR ble tatt i bruk 25. mai 2017 men er gjeldende først fra og med 25. mai 2022. Dette gir en femårs overgangsperiode slik at produsenter og institusjoner som faller innenfor virkeområde til regulativet kan oppdatere sine protokoller og sin praksis til å være i tråd med de nye reglene (<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/746/oj/eng>, artikkel 110, 23.03.2020). Selv om IVDR vil være gjeldende for alle medisinske laboratorier i Norge, begrenses denne rapporten til et utvalg av immunhistokjemiske analyser ved Enhet for immunhistokjemi som benytter antistoff. Disse antistoffene er definert som in vitro medisinsk utstyr av IVDR. Eksemplene som brukes i denne rapporten ble tildelt ved prosjektets start og er representative for analyser som utføres ved enheten. Antistoffene er i bruk i dag og viser forskjellige problemstillinger enheten må vurdere under de nye reglene. Oppgaven går ut på å gjennomgå regulativet og vurdere hvilke konsekvenser innførelse av IVDR vil ha for Enhet for immunhistokjemi med hensyn til disse spesifikke analysene. Bruken av enkelte antistoff ved enheten avviker på ulike måter fra det som er spesifisert av produsent. Denne rapporten skal undersøke hvorvidt denne praksisen kan videreføres i sin helhet, eller om det må gjøres endringer for å være i henhold til IVDR. Dette vurderes gjennom konkrete eksempler på bruk av antistoff.

Følgende problemstilling er valgt for rapporten; Hvorfor innføres det et nytt regulativ, når det allerede finnes et direktiv på plass, og hvordan vil dette påvirke laboratorier (med utgangspunkt i Enhet for immunhistokjemi ved Avdeling for patologi).

Denne rapporten er bygd opp etter IMRoD-modellen (Introduksjon, Material og metode, Resultat og Diskusjon) (*Senter for faglig kommunikasjon (SEKOM) - IMRoD - NTNU, 24.04.2020*). I innledningen presenteres problemstilling og bakgrunn for denne. Deretter presenteres teori som er nødvendig for å lese og forstå rapporten. Metodekapittelet går inn på metoden som er benyttet og potensielle feilkilder knyttet til denne. Selve arbeidsmetoden blir deretter forklart. Eksemplene brukt i denne rapporten presenteres også her. I resultatdelen presenteres funnene, som består av utdrag fra IVDR med tolkning. I diskusjonsdelen gis det generelle anbefalinger angående rutinene til Enhet for immunhistokjemi, samt anbefalinger til hvert eksempel.

1.2. Teori

1.2.1. EU-direktiv og -regulativ

Målene og avtalene i EU oppnås gjennom ulike juridiske bestemmelser der noen er mer bindende enn andre. Direktiv og regulativ er to eksempler på dette. IVDR er et regulativ som erstatter et direktiv.

Et EU-direktiv setter krav om et mål som alle medlemmer i EU og EØS må følge. Dette betyr at alle landene skal oppnå målet som er beskrevet i direktivet, men de står selv fritt til å bestemme hvordan. Det er dermed opp til de enkelte land å ha lover som bestemmer hvordan de skal oppnå kravene gitt i direktivet (https://europa.eu/european-union/eu-law/legal-acts_en, 12.05.2020).

Et regulativ er strengere enn et direktiv da det skal implementeres i alle EU-land i sin helhet. Her skisseres målsetninger og hvordan de skal oppnås. Dette overstyrer lokale lover. Hensikten med innføring av IVDR er å øke pasientsikkerheten, fremme innovasjon, sikre god sporbarhet på produksjon og bruk av IVMU (in vitro medisinsk utstyr), samt sikre at gjennomførelse av regelverket er lik i alle medlemslandene. Regulativet skal hindre at utrygt utstyr plasseres i markedet og sikre at det er åpenhet i måten det reguleres på.

1.2.2. Oppbygning og innholdet i IVDR

IVDR er inndelt i ti kapitler. Disse omtaler hvert sitt hovedtema som for eksempel introduksjon, sporbarhet og juridiske emner. Kapitlene inneholder seksjoner som hver omtaler ett spesifikt emne. Innunder seksjonene kommer artiklene som inneholder de spesifikke punktene i regulativet. Hver artikkel har et unikt nummer som er uavhengig av kapitlet det tilhører. For at IVDR skal kunne tolkes riktig inneholder artikkel 2 definisjoner som gjelder hele regulativet. IVMU til bruk i diagnostikk defineres her som alt medisinsk utstyr som er et reagens, reagens produkt, kalibrator, kontrollmaterial, kit, instrument, apparat, programvare eller system som brukes alene eller i kombinasjon og som av produsent er beregnet for bruk til in vitro undersøkelser av prøver fra mennesker, inkludert vev og blod, for å få informasjon om sykdom

eller som kan brukes til behandling av sykdom (<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/746/oj/eng>, artikkel 2 seksjon 2, 23.03.2020). Andre definisjoner som er relevante for rapporten er omtalt i resultatdelen.

IVDR er et regelverk som hovedsakelig gjelder for produsenter av IVMU, og inneholder kravene som må oppfylles før et produkt kan slippes til markedet. Denne rapporten går ikke i detalj på hvilke krav som gjelder for produsent, men det bør nevnes at produkter som kjøpes inn av laboratorier, og som er i henhold til IVDR, krever omfattende dokumentasjon som beviser at produktet oppnår regulativets krav. Inkludert krav til sporbarhet, risikostyring, ytelsesstudier, klinisk utprøving, kvalitetssystem samt merking og pakking av produkter ((<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/746/oj/eng> , artikkel 56, 23.03.2020).

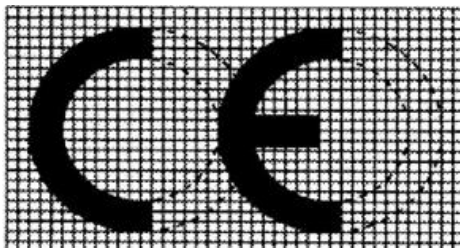
1.2.3. Sporbarhet, klassifikasjon og CE-merking

Noen av de viktigste endringer fra direktivet til IVDR er økt krav til sporbarhet og risikovurdering for IVMU. Bedre sporbarhet skal oppnås via innføring av EUDAMED (European database on medical devices) som er en database som har til mål å samle informasjon om IVMU. Dette vil gjøre informasjonen lettere tilgjengelig for brukere og hindre at produsenter må gjøre informasjon tilgjengelig flere steder (<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/746/oj/eng>, introduksjon pkt. 41. 23.03.2020). For å kunne registrere et produkt i EUDAMED må produktene få en UDI-kode (Unique Device Identification). Koden skal sikre bedre sporbarhet for IVMU (<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/746/oj/eng>, artikkel 24 og annex VI. 23.03.2020).

Det er alltid forbundet en viss risiko ved bruk av utstyr som er beregnet til in vitro diagnostikk. Dette kan for eksempel være relatert til pasientsikkerhet, og må vurderes opp mot konsekvens, både ved produktfeil og brukerfeil. Konsekvensen ved feil resultat kan for eksempel føre til feil eller manglende behandling. Under direktivet ble risiko ikke klassifisert. Et nytt system for risikovurdering og klassifisering er en av de største utvidelsene i IVDR. Alt utstyr skal nå gjennomgå en risikovurdering og klassifiseres i kategorier fra A til D. A representerer den mildeste klassen (lav risiko), og D den strengeste (høy risiko). IVDR stiller ulike krav til de forskjellige risikoklassene. Eksempel på klasse D er utstyr som skal benyttes til in vitro

diagnostikk der det er risiko også utover pasientens sikkerhet, som ved analyse av transfusjonsprodukter, ABO-screening eller ved analyse av smittsomme sykdommer som HIV og hepatitt B (<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/746/oj/eng>, *annex VIII, pkt. 2.1. 23.03.2020*). Eksempler på IVMU som klassifiseres som A er bufferløsninger, vaskeløsninger eller annet ikke-kritiske utstyr som benyttes ved in vitro analyser (<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/746/oj/eng>, *annex VIII, pkt. 2.5. 23.03.2020*). Antistoff i immunhistokjemiske analyser benyttes i diagnostisering og klassifisering av kreft, og tilstedeværelse av markører kan i noen tilfeller si noe om behandlingsalternativer. Antistoff faller dermed under klasse C fordi feil eller mangler med reagenset kan gi en økt risiko for pasientsikkerheten (<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/746/oj/eng>, *annex VIII, rule 2. 23.03.2020*).

For å bevise at kravene som IVDR setter til et produkt er oppfylt, må produsenter gjennomføre en sertifisering av produktene, en *conformity assessment* (<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/746/oj/eng>, *artikkel 2, pkt. 32. 23.03.2020*). Som bevis på at produktet er sertifisert skal både produkt og tilhørende materiale bære CE-merket synlig, se Figur 1:1. Et produkt som er CE-merket kan bevege seg fritt i EU-markedet. Arbeidet som produsenter har gjort for å få sine IVMU produkter CE-merket er kun gjeldende dersom produktet brukes slik som beskrevet. Dette defineres i IVDR som “intended use” og er i denne rapporten oversatt til “tiltenkt bruk” (<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/746/oj/eng>, *artikkel 2, pkt. 12. 23.03.2020*). Bruk som avviker fra tiltenkt bruk, er dermed i utgangspunktet ikke i henhold til IVDR. Informasjonen som definerer tiltenkt bruk kan være gitt i datablad, på etikett/merkelapp, i brukermanual eller i form av andre uttalelser fra produsent.

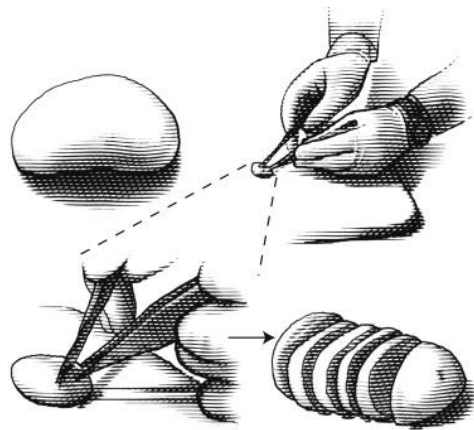


Figur 1:1 – Godkjent CE-merke som skal være synlig på produkter, inkludert IVMU, som har oppfylt kravene satt frem av EU

1.2.4. Histopatologi og immunhistokjemisk metode (IHC)

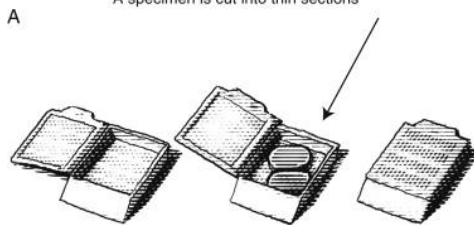
Innen histopatologi undersøkes ulike vev for sykdomstilstander. For å studere vevet blir det laget vevspreparater som farges til mikroskopisk undersøkelse. Vevet fjernes fra pasienten under operasjoner, biopsier eller obduksjoner, og for å unngå autolyse må vevet formalinfixeres umiddelbart. Dette skal derfor helst gjøres der operasjonen/biopsien/obduksjonen finner sted. Patologilaboratoriet mottar vev på formalin og mottaksregistrerer det i et datasystem. Ved registrering brukes det kassetter med et unikt prøvenummer som er knyttet til pasienten. Vevet skal måles og beskrives, og ved behov skjæres det også opp i mindre biter – makrobeskjæring. Deretter framføres vevet, dette er prosessen hvor vann fjernes og erstattes av parafin, før vevet støpes til en parafinblokk. Fra denne blokken kan vevet snittes i tynne snitt som legges på objektglass. Figur 1:2 viser prosessen fra makrobeskjæring til snitt som er klare til farging.

Minst ett preparat fra hver blokk farges med standard fargemetode HE (Hematoxylin Eosin), for å få en oversikt over histologien i vevet. Denne metoden bruker hematoxylin til å farge cellekjerner mørkelilla og eosin til å farge cytoplasma rosa (*Nastic & Wagner, 2013, side 11*). Ved behov kan vevspreparatene også spesialfarges med ulike metoder for å gi spesifikk informasjon om ulike strukturer i vevet (*Taylor & Rudbeck, 2013, side 12*). IHC-farging er en slik spesialfargemetode som benytter antistoff for å påvise tilstedeværelse av spesifikke markører – antigen – i vevet. Innenfor patologi benyttes dette blant annet til å bestemme prognose og eventuelt behandling av kreft og andre patologiske tilstander.



A. Tissue is grossly serially sectioned (2 to several mm) to look for small lesions.

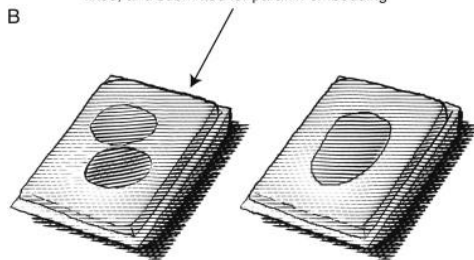
A specimen is cut into thin sections



Sections are placed into cassettes, fixed, and submitted for paraffin embedding

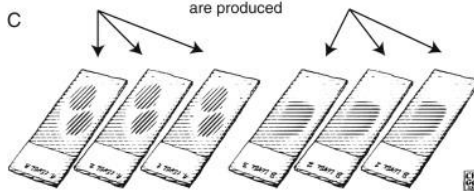
B. Cassette: The tissue is placed in a plastic cassette for processing. The tissue slices should be no thicker than 0.3 cm and should fit loosely in the cassette to allow access to all of the reagents.

In general, tissue processing (dehydration, clearing, and infiltration by paraffin) requires several hours and is usually performed overnight.



In this example, 2 paraffin blocks are produced

C. Block: Each block consists of the tissue in the cassette embedded in paraffin and attached to the bottom of the same cassette for identification.



Glass slides (three levels in this example) are produced for each block

D. Slide: A microtome is used to generate a thin slice (less than the thickness of a cell — typically 4 microns) from each block for mounting on a glass slide for microscopic examination.

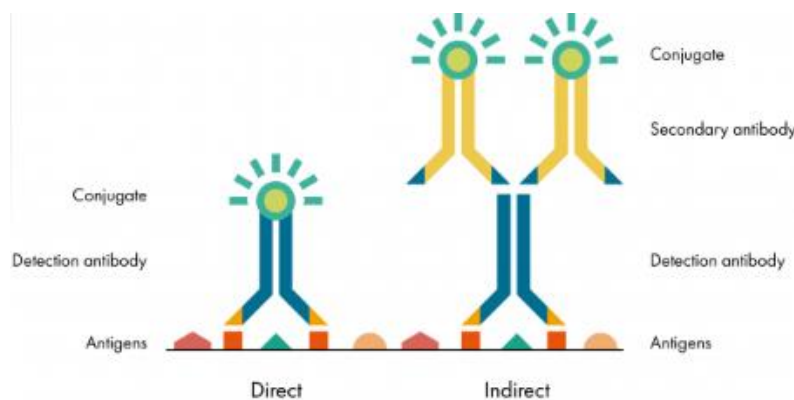
Levels: If 4-micron slices are cut, a 0.3-cm thick tissue section can yield up to 750 glass slides (levels). For special stains, "no waste" slices (i.e., consecutive slices) can be used. To evaluate more of the tissue in the block, sections from deeper levels within the tissue are prepared—typically 20 microns apart. In order to evaluate all the tissue in a block (e.g., sentinel lymph nodes for breast cancer) levels may need to be prepared from sections several hundred microns apart.

Figur 1:2 – Oversikt av prosessen for å lage preparater til HE og IHC fra formalin fiksert vev til ferdig laget preparater. A) Viser makrobeskjæring av vev til mindre biter. B) Vevet plasseres i kassetter med unikt prøvenummer, disse vevsbitene må ha en viss størrelse for at kassetten skal kunne lukkes. C) Etter fremføring og støpning, får man en paraffinblokk som brukes til å lage tynne vevssnitt. D) Mikrotomer brukes til å lage tynne snitt slik at man kan kutte mange snitt fra samme vevsblokk.

IHC-farging krever forbehandling av vevspreparatet før antistoffet kan tilsettes. Dette er fordi fiksering med formalin fungerer ved at det dannes kryssbindinger mellom formalinen og

reaktive aminogrupeer i proteiner i vevet. Kryssbindingene gjør at proteinene endrer konformasjon og maskerer antigenene slik at antistoff ikke lar seg binde. For at epitopene skal gjenopprettes (recovery) må derfor disse kryssbindingene brytes; dette gjøres ved bruk av forskjellige forbehandlingsmetoder. De mest vanlige forbehandlingsmetodene bruker varme, enzymer eller en kombinasjon av disse til å gjenopprette opprinnelig konformasjon av antigener. Peroksidase finnes endogent i en del vev og kan gi uspesifikk farging ved bruk av DAB-visualiseringssystem. En del analyser krever derfor blokkering av endogen peroksidaseaktivitet før eller etter tilsetning av primærantistoff.

Antistoff binder de antigenene de er rettet mot på en spesifikk måte. Det finnes mange ulike antistoff som kan benyttes og de kan synliggjøres enten direkte eller indirekte. For å kunne se om bindingen har funnet sted, benyttes det en markør som konjugeres– enten direkte eller indirekte – til antistoffet som er bundet til antigenet. Markør i eksemplene i denne rapporten gir et farget resultat. Et farget resultat vil da tyde på et positivt signal som tilsier at det aktuelle antigenet er til stede i vevet. Figur 1:3 viser forskjellen mellom direkte og indirekte metode.



Figur 1:3 – Bildet viser forskjellen mellom direkte og indirekte metode. Ved direkte metode er primært antistoff konjugert med en forbindelse som gir et signal (fluorescens eller farge) som synliggjør bindingen mellom antistoff og antigen. Ved indirekte metode benyttes det først et primært antistoff som binder antigenet som ikke er konjugert, og deretter et sekundært antistoff som er konjugert til å synliggjøre bindingen.

1.2.5. *Utfordringer innen IHC*

Protokoll er betegnelsen på fremgangsmåten til en analyse med spesifikke betingelser. Valg av type antistoff og protokoll som benyttes til immunanalyser vil variere med type vev og type antigen som skal påvises. Protokollene utvikles og valideres i et laboratorium når en ny analyse skal innføres der. Protokoller er viktig for at metoder skal kunne standardiseres og reproduseres slik at variasjon i resultatene minimeres, resultatene er av høy kvalitet og at kvaliteten kan overvåkes. Resultater av IHC-farging kan være enten kvalitative eller semi-kvantitative. De fleste metodene er kvalitative og skal bekrefte om prøvematerialet inneholder et spesifikt antigen eller ikke. Et godt resultat er tydelig farging av de antigenene man ønsker å påvise, uten farging av andre komponenter i vevet. Optimalisering av protokoller skal derfor fokusere på å fremstille et tydelig signal ved tilstedeværelse av det aktuelle antigenet slik at det lett kan skilles mellom negative og positive resultat (*Taylor & Rudbeck, 2013, side 60.*).

Manglende standardisering har vært en bekymring siden IHC-metoder først ble tatt i bruk (*Taylor & Rudbeck, 2013, side 10*). Utfordringene er knyttet til at det ikke er alle parametere som kan kontrolleres av laboratoriet. Dette gjelder for eksempel fiksering. Vevet legges som regel på formalin før det ankommer laboratoriet, men tidspunktet for når dette blir gjort er ikke nødvendigvis angitt. Både tid, type og mengde fikseringsmiddel har innvirkning på resultatet. Naturlige individuelle forskjeller gjør også at antigen uttrykkes ulikt i mennesker – noen pasienter har høyt uttrykk av en viss markør der andre har lavt. Dette kan skyldes genetisk variasjon.

Epitoper kan gjenopprettes ved bruk av forskjellige forbehandlingsprosedyrer, men standardisering av disse er også en utfordring. Bestemmelse av en best egnet forbehandlingsprotokoll er basert på empiriske forsøk på å produsere et resultat som egner seg for diagnostisering. Produsenter av antistoff vil som regel anbefale en forbehandlingsmetode som laboratorier kan ta utgangspunkt i når de skal innføre en ny metode. Men laboratorier vil ofte også ta utgangspunkt i egne erfaringer og/eller protokoller som er testet hos andre laboratorier eller organisasjoner. Hvilke automatiserte instrumenter som brukes vil også påvirke hvilke forbehandlingsalternativer som er aktuelle for et laboratorium å bruke.

Andre parametere i protokoller som varierer er fortynning av antistoffkonsentrat og inkubasjonstid av antistoff på preparat. Både ulik inkubasjonstid og forskjellige konsentrasjoner av antistoff fører til forskjellig fargerresultat av samme preparat. Også her kan man ved validering av protokoller ta utgangspunkt i anbefaling fra produsent av antistoffet som brukes.

På grunn av de store variasjonene i biologiske, pre-analytiske og analytiske faktorer er det vanlig at hvert enkelt laboratorium utvikler sine egne metoder og protokoller til IHC-analysene de tar i bruk. Denne manglende standardiseringen representerer en utfordring ved innføring av IVDR siden laboratorier modifiserer IVMU i sine analyser. IHC er et felt i utvikling og det lages nye antistoff og metoder i et høyt tempo. Det er flere nasjonale og internasjonale program som arbeider med å få på plass større grad av standardisering innenfor feltet, men slik det gjøres i dag er det store variasjoner fra laboratorium til laboratorium.

1.2.6. *IHC ved Enhet for immunhistokjemi*

Avdeling for patologi (AP) er en av seks avdelinger som er underlagt Laboratoriemedisinsk klinikk (LMK) ved St. Olavs hospital. AP er ansvarlig for diagnostikk og undersøkelse av biopsiprøver, cytologiske prøver, samt gjennomførelse av obduksjoner (*Avdeling for patologi - St. Olavs hospital, 30.03.2020*). Immunhistokjemi er hovedfokus i denne rapporten, og Enhet for immunhistokjemi tilhører seksjon for spesialanalyser patologi. Patologer ved AP ser gjennom HE-fargede preparater, og bestiller ved behov IHC-farging fra Enhet for immunhistokjemi. Noen av disse analysene har direkte betydning for behandling, mens andre kun brukes til diagnostikk.

IHC-farging hos enheten utføres ved bruk av BenchMark Ultra som er et automatisk IHC- og in situ hybridisering fargeinstrument fra produsenten Roche (*BenchMark ULTRA system, 07.05.2020*). Enheten har tilgang til fem slike instrumenter som de kan bruke til sine analyser. Enheten eier ikke instrumentene, men betaler per analyse de kjører. På grunn av dette kjøres instrumentene utelukkende med reagenser som er anbefalt av Roche. Et eksempel på dette er forbehandlingsreagenset Cell Conditioning 1 (CC1), som er en ferdig fortynnet bufferløsning til epitopgjenoppbygging (*Cell Conditioning 1 (CC1), 24.04.2020*). Instrumentene kan

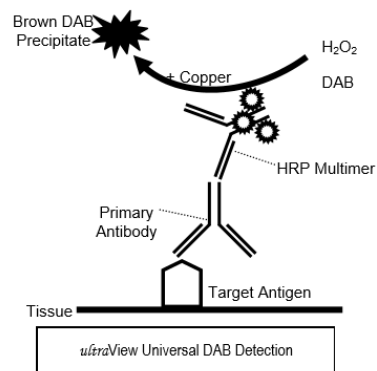
programmeres med mange ulike protokoller hvor de fleste parametrene kan være egendefinerte, som for eksempel inkuberingstid (*BenchMark ULTRA system, 16.04.2020*). Dette gir fleksibilitet i utvikling og optimalisering av protokoller.

Analysene som diskuteres i denne rapporten benytter indirekte metode for å synliggjøre bindingen mellom antistoff og antigen. Det brukes to forskjellige deteksjonssystemer ved enheten som heter UltraView og OptiView. Begge disse er produsert av Ventana og er beregnet til bruk i BenchMark Ultra. De er klar-til-bruk (RTU) reagenser som betyr at de ikke trenger å fortynnes før de tas i bruk.

Protokollene som lages i BenchMark Ultra er bygd opp etter samme fremgangsmåte, vist forenklet under:

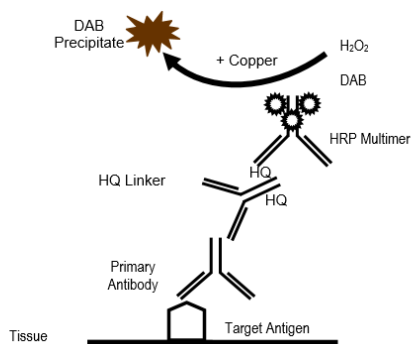
1. Forbehandling: Epitopgjenoppretting ved bruk av CC1.
2. Tilsetning av primærantistoff. Dette er et antistoff som er spesifikt for hver analyse. Dette kan kjøpes som konsentrat eller RTU.
3. Deteksjonssystemet: OptiView og UltraView bruker ulike prinsipp for binding til primærantistoff, men har likt kromogen-substrat-prinsipp, se Figur 1:4 og Figur 1:5.
 - a. Peroxidasehemmer: 3 % hydrogenperoksidløsning. Minimerer bakgrunnsfarging. Dette reagenset er likt for både OptiView og UltraView.
 - b. Sekundærantistoff: OptiView og UltraView bruker ulike reagenser til dette.
 - c. Tertiært antistoff: brukes kun av OptiView.
 - d. DAB +H₂O₂: Kromogensubstratet som gir farget produkt; dette er likt for både OptiView og UltraView.
 - e. Kobber: Dette er likt for både OptiView og UltraView. Funksjonen til kobber er å forsterke DAB-fargen.

UltraView deteksjonssystem påviser primære antistoff fra mus og kanin bundet til et antigen i parafinstøpte vevssnitt. Systemet er en to-trinns metode som benytter et enzymkonjugert sekundært antistoff som bindes til primært antistoff bundet til antigenet, se Figur 1:4 (*ultraView Universal DAB Detection Kit, 23,04.2020*). Positivt resultat bekreftes ved dannelse av brun farge hvor markører befinner seg på preparat.



Figur 1:4 – Illustrasjon av prinsippet bak deteksjonssystemet UltraView. Først bindes primært antistoff til antigen i vevet, og deretter bindes enzym konjugert sekundært antistoff til primært antistoff. Når enzymet reagerer med substrat dannes en brun utfelling som indikerer at ønsket markør er til stede.

OptiView deteksjonssystem påviser primært antistoff fra kanin og mus i en tre-trinns metode hvor det først brukes et sekundært antistoff til å finne primært antistoff bundet til vevet (*OptiView Amplification Kit*, 07.05.2020). Deretter brukes det et tertiært antistoff som er konjugert med enzym til å danne fargeutfelling ved binding av primært antistoff når substrat tilsettes reaksjon, se Figur 1:5.



Figur 1:5 – Illustrasjon av prinsippet bak deteksjonssystemet OptiView. Først bindes ukonjugert primært antistoff til vevet, og deretter bindes ukonjugert sekundært antistoff til primært antistoff, og til slutt bindes det et tertiært antistoff som er konjugert med et enzym som danner brun fargeutfelling når enzymet reagerer med substrat H2O2.

OptiView systemet anses som det mest sensitive av de to metodene siden det bruker en 3-trinns metode, mens UltraView systemet er mer spesifikt. Hos Enhet for immunhistokjemi ble det bestemt på grunnlag av erfaring at alle analyser skal benytte OptiView uavhengig av hva som er anbefalt av produsentene til antistoffet. Unntak til dette er analysene ER (østrogen reseptor) PGR (progesteron reseptor) og HER2 (human epidermal vekst faktor) som har direkte betydning

for behandling. Disse utføres med UltraView fordi dette anbefales av produsenten av antistoffene.

1.2.7. *Kvalitetskontroll ved avdeling for patologi og Enhet for immunhistokjemi*

AP benytter det elektroniske kvalitetsstyringssystemet EQS (Extended Quality System) i likhet med resten av St. Olavs hospital. Kvalitetssystemet har to nivå, et globalt med dokumenter som gjelder for hele sykehuset, og et lokalt som gjelder AP. EQS dokumentet 24616, revisjon 2.13 - *Kvalitetshåndbok Avdeling for Patologi (AP)* er benyttet i denne rapporten for å se på kvalitetskontrollrutinene. Dette dokumentet omfatter kravene i NS-EN ISO 15189:2012 (*EQS 24616 rev.2,13*).

Det er avdelingsleder sammen med medisinsk ansvarlig som har ansvar for avdelingens analyserepertoar, og det er en egen EQS prosedyre for valg, validering og innføring av nye analyser. Alle analyse- og metodebeskrivelser samt periodisk gjennomgang av disse skal dokumenteres i EQS. Alle metodene skal overvåkes gjennom interne kvalitetskontroller og eventuelt også eksterne kontroller eller gjennom laboratorieprøvinger. I tillegg skal analyserepertoaret gjennomgås av ledelsen (*EQS 24616, rev 2.13*).

Enhet for immunhistokjemi er med i de eksterne kvalitetssikringsprogrammene til NordiQC og UK NEQAS. Disse organisasjonene har som hovedmål å fremme kvalitet innen IHC-feltet. Basert på alle innsendte bidrag fra deltagere, lager organisasjonene anbefalinger til protokoller på sine nettsider som laboratorier kan benytte til sine analyser. Hver deltager får også individuelle resultater med eventuelle kommentarer på hva som bør endres. Til analysene i denne rapporten ble det kun sett på anbefalinger fra NordiQC (*EQS 24616, rev 2.13*).

For å teste spesifisiteten og sensitiviteten til antistoffene som benyttes i rutineanalyser hos enheten, farges kontrollsnitt på samme objektglass som alle prøvene. Kontrollsnittene lages fra en multivevsblokk (MTb) som består av ulike typer vev. Til dette brukes rest- eller pasientmateriale tilgjengelig fra ulike vevsprøver mottatt hos AP. Ulike vev støpes sammen og bør helst inneholde egnet vevstyper med varierende forekomst av antigenkonsentrasjon til både

positiv og negativ kontroll. MTb har ulike sammensetninger, og hvilket vev som brukes velges ut ifra hvilken analyse som skal kjøres.

Kvalitetsarbeidet nevnt i dette avsnittet er bare et utvalg av det som gjøres. AP har et helhetlig kvalitetssystem som skal sikre arbeidet i alle ledd. Det er også planlagt fremtidig arbeid for å bedre kvaliteten, deriblant et laboratorienettverkt med digital patologi som skal jobbe med standardisering av protokoller i Norge.

2. MATERIALE & METODE

2.1. Metode

2.1.1. *Kvalitativ metode og bias*

Denne rapporten er basert på innsamling, organisering og vurdering av skriftlig og muntlig materiale som er brukt i tolkningen av et nytt regulativ og se det i sammenheng med bruk av antistoff ved Enhet for immunhistokjemi ved St. Olavs hospital. Metoden som er brukt i bacheloroppgaven anses som en kvalitativ metode der både innsamling og tolkning av informasjon skjer parallelt. Informasjonen samles ved å bruke eksempelvis intervjuer, casestudier, gruppesamtaler eller rå teoretiske data (*Chapter 05, 06.04.2020*). Dette gir et detaljert innsyn i det emnet det skal forskes på. Kvalitative metoder bruker data innhentet fra forskjellige kilder, og det er viktig å vurdere om disse er pålitelige eller ikke. Dette forutsetter bruk av godkjente, fagfellevurderte kilder for å sikre en pålitelig metode.

Data som samles inn må tolkes, og denne tolkningen kan påvirkes av personlig stil og individuelle meninger. Dette er kjent som bias, og er definert som enhver påvirkning som fører til en forvrengt tolkning av data (*Galdas, 2017*). Forståelse og gjenkjennelse av dette er nødvendig for å minimere feilaktig tolking av data. Bias kan forekomme enten med eller uten bevisst intensjon (*Grenness, 1997*).

2.1.2. *Metode i denne rapporten*

Særlig fokus i denne rapporten er tolking av IVDR. Det innebærer innsamling, sortering og presentasjon av informasjon som er relevant for å forstå hvordan problemstillingen kan besvares. En utfordring med gjennomføringen i denne rapporten er at IVDR er et juridisk dokument som er skrevet på engelsk, og som tolkes av bioingeniører og oversettes til norsk.

For å se på hvordan IVDR vil påvirke arbeidet ved Enhet for immunhistokjemi er det nødvendig med en forståelse av metodene som brukes. Dette gjelder særlig kunnskap om immunhistokjemisk metode som er presentert i denne rapporten. Generell teori om immunhistokjemi er hentet fra et hefte utgitt av Dako. Dette inneholder informasjon om immunhistokjemiske fargemetoder, inkludert alle trinnene innen IHC-analyser, samt utfordringer ved bruk av IHC-farging. Heftet er en del av pensum under i HBIO2006 – Medisinsk Laboratorieteknologi; immunologiske, cytologiske og histologiske teknikker, som er en del av Bioingeniørutdannelsen ved NTNU i Trondheim, og anses derfor som en pålitelig kilde.

Hovedkilde til informasjon angående prosedyrer og arbeidsmetoder hos Enhet for immunhistokjemi er Spesialbioingeniør Lise Eid Wålberg (videre omtalt som veileder) som selv jobber med tolkning og innføring av IVDR hos enheten. Oppgaven ble utformet sammen med veiledere, og kommunikasjon foregikk via e-post og nettbaserte samtaler. Informasjon om organisasjonen hos enheten ble hentet fra EQS-dokumenter som beskriver kvalitetssystemer og prosessene rundt testing av nye antistoff, inkludert utprøving og validering. Informasjon om NordiQC, Statens legemiddelverk, direktivet og regulativet er hentet fra offentlige nettsider.

Spørsmål angående protokoller og prosedyrer hos enheten som ikke ble funnet i dokumentasjon ble sendt til veileder. Disse spørsmålene er besvart ut ifra erfaringen hun har oppnådd ved å jobbe hos enheten. Siden mye av denne informasjonen fra veileder er tatt fra erfaring eller kunnskap om hvordan analysene fungerer hos enheten, er ikke dette sitert med kilde i oppgaven. Denne informasjonen anses likevel som pålitelig basert på hennes mangeårige erfaring.

2.1.3. Gjennomføring

Denne rapporten har to forfattere. Begge har skrevet på rapporten hver for seg i et online dokument, og kommunikasjon har foregått via e-post, chat-samtale og videoanrop. Problemstillingen ble utarbeidet i samarbeid med veileder. Rapporten er skrevet i flere deler, der hver forfatter har hatt ansvar for å utforme første utkast av sin del. Deretter er det samarbeidet om å gjennomgå og redigere teksten. Teksten er sendt til veiledere og rettet etter kommentarer.

Det var ikke planlagt en fremgangsmåte som ble fulgt fra starten ved skriving av metodedelen. Derfor er denne delen skrevet i etterkant, for å beskrive hvordan arbeidet med oppgaven ble utført.

Resultatdelen er også skrevet underveis. IVDR ble gjennomlest og innholdet ble diskutert. Deretter ble hele regulativet limt inn i et dokument og gjennomgått på nytt. Det som ble vurdert som irrelevant ble så tatt vekk. Enda en ny runde avgjorde hva som var relevant for denne rapporten og dette er inkludert i avsnitt 3.1.

Informasjonen i tabellene 3.2.1- 3.2.6 i avsnitt 3.2. er hentet fra valideringsrapportene for antistoffene fra AP og valideringsplanen til ROS1, og fra pakningsvedleggene til antistoffene. Herfra er det sett på informasjon som gjengir produsentenes anbefalinger og bruk på AP som beskrevet i valideringsplan og rapporter. Deretter er det satt inn informasjon fra pakningsvedlegg, valideringsplaner og -rapporter. Det er forsøkt å se hva som er gitt som eksempler og anbefalinger fra produsenter, og hva som er angitt mer bestemt.

2.2. Material

2.2.1. *Valideringsplan og -rapporter*

Når et nytt antistoff skal implementeres i analyseregisteret til Enhet for immunhistokjemi, skal det først utføres en utprøving av antistoffet ved forskjellige betingelser. Før utprøving lages det en valideringsplan som inneholder informasjon om antistoff og hensikt med implementering av antistoff. Valideringsplanen inneholder beskrivelse av de parameterne som skal testes, samt hvilket utgangspunkt som benyttes for protokollen.

Etter at utprøvingen er gjort utarbeides det en valideringsrapport. Denne skal inneholde informasjon om parameterne som brukes, hvilken deteksjonsmetode som benyttes, hvordan preparatene skal forbehandles, hvor mange prøver som forventes å utføres hos avdelingen med det nye antistoff per år, informasjon om pris, og resultater av utprøving. For kvalitetssikring og sporbarhet inneholder valideringsrapporten og valideringsplaner blant annet produktinformasjon

om antistoffet som skal testes, referansemetode, om det finnes en referansemetode det kan henvises til, kostnadsberegninger, bruksområde og klinisk nytte.

For denne rapporten er valideringsrapporter fra enheten benyttet til å vurdere om bruken av antistoff er endret i forhold til produsentens tiltenkte bruk og eventuell begrunnelse for endringer som er gjort. De er også brukt til å vurdere om dokumentasjonskravene satt frem av IVDR er møtt. For å se et eksempel på valideringsrapport og informasjonen i en slik rapport, se Vedlegg B: Valideringsrapport CD163.

2.2.2. Reagensvedlegg

Antistoffene som kjøpes inn av Enhet for immunhistokjemi følges som regel av informasjon fra produsenten. Denne informasjonen inkluderer produktkode som identifiserer produktet og lot/batch nummer som skal sikre sporbarhet i alle analysene det benyttes i.

Produsenten skal gjøre tilgjengelig informasjon om sine produkter. Det kan gjøres i pakkingsvedlegg, eller gjennom nettside. Her skal det være beskrevet tiltenkt bruk. Enkelte produsenter spesifiserer betingelser som må følges nøyaktig, mens andre nøyer seg med anbefalinger. Eksempler på slike betingelser er fortynningsområde, deteksjonssystem, og informasjon om egnet kontrollmaterial. I denne rapporten er reagensvedlegg brukt til å vurdere tiltenkt bruk for de gjennomgåtte eksemplene.

2.2.3. Antistoff

For å begrense omfanget av denne rapporten, ble det brukt et utvalg av antistoff i fire kategorier, som representerer hvordan antistoff brukes ved enheten. Utvalget ble plukket ut av veileder. Antistoff i alle eksemplene benyttes til påvisning av antigener/proteiner som er markører for krefttilstander.

Punktene under gir beskrivelse og hensikten ved analyse av antigener, som er proteiner, som skal identifiseres ved bruk av antistoff. Det som betegnes “klon” er antistoff (reagens) som

brukes til å identifisere disse antigenene. Beskrivelse av antigenene brukes i rapporten til å forstå hensikten med bruk av antistoff til analysene hos enheten.

Kategori 1: Analyse der man bruker konsentrert primærantistoff som fortynnes på laben. Disse eksemplene vises i Tabell 2:1 og Tabell 2:2

Tabell 2:1 – Eksempel 1 CD163 antigen

Produktkode:	NCL-L-CD163
Protein/antigen:	CD163
Antistoff klon:	10D6
Oppgaven til proteinet i kroppen:	CD163 er et membranprotein som har som oppgave å hjelpe kroppen å kvitte seg med hemoglobin- og haptoglobinkomplekser. Proteinene har anti-inflammatoriske funksjoner.
Klinisk relevans:	CD163 finnes i nesten alle tilfeller av akutt myeloid leukemi med monocyt differensiasjon og i de fleste tilfeller av histocytær sarkom og andre sykdommer. CD163 antigen brukes til deteksjon av cellene med monocytisk og histocytisk opprinnelse, men også i bløtsvevpatologi generelt (<i>NordiQC - Immunohistochemical Quality Control, 27.03.2020</i>)
Analyse relevant for behandling:	Nei

Tabell 2:2 – Eksempel 2, CDX2 antigen

Produktkode:	CMC23531060
Protein/antigen:	CDX2
Antistoff klon	EPR2764Y
Oppgaven til proteinet i kroppen:	Gen som koder for transkripsjonsfaktorer nødvendig for intestinal organogenese (fase i embryoutvikling hvor organer dannes, <i>Davies, 2004</i>).
Klinisk relevans:	En relativt sensitiv markør som er ganske spesifikk for adenokarsinom i GI-trakten, og dermed nyttig for diagnostikk av metastaserende tumorer med ukjent opprinnelse (<i>EQS 41326, rev.1.1</i>)
Analyse relevant for behandling:	Nei

Kategori 2: Analyse med antistoff som kun er beregnet for forskning, se Tabell 2:3

Tabell 2:3 – Eksempel 3 H3G34W antigen

Produktkode:	SKU: 31-1145-00
Protein/antigen:	H3G34W
Klon:	RM263
Oppgaven til proteinet i kroppen:	Ingen kjent oppgave i kroppen.
Klinisk relevans:	Mutasjoner i H3G34W befinner seg i pasienter med kjempecelletumor i bein og pasienter med maligne og benigne imitatorer. Cirka 90% av kjempecelletumorer er positiv for H3G34W og identifikasjon av denne markøren i vev kan forhindre forsinket kreftdiagnose (<i>EQS 40948 rev. 1.1</i>).
Analyse relevant for behandling:	Nei

Kategori 3: Analyser der det brukes RTU primærantistoff, som har avvik fra produsentens tiltenkte bruk. Se Tabell 2:4 og Tabell 2:5.

Tabell 2:4 – Eksempel 4, PAX 5 antigen

Produktkode:	790-4420
Protein/antigen:	PAX 5
Antistoff klon:	SP34
Oppgaven til proteinet i kroppen:	Koder for en transkripsjonsfaktor som spiller en viktig rolle i B-celleutvikling.
Klinisk relevans:	PAX 5 er et gen som beregnes som onkogen, dvs. det stimulerer proliferasjon av cellene som kan føre til kreft. Overuttrykk eller feil uttrykk av PAX 5 finnes i kreft av B-celler som for eksempel lymfom og lymfocytisk leukemi. Antistoff brukes til diagnostisering av disse sykdommene (<i>O'Brien et al., 2011</i>).
Analyse relevant for behandling:	Nei

Tabell 2:5 – Eksempel 5, WTI antigen

Produktkode:	760-4397
Protein/antigen:	WT1
Antistoff klon:	6F-H2
Oppgaven til proteinet i kroppen:	Koder for en transkripsjonsfaktor som spiller en rolle i utvikling av urinveiene og genitalia (<i>NordiQC - Immunohistochemical Quality Control, 30.03.2020</i>).
Klinisk relevans:	Markøren brukes hovedsakelig for å skille serøse ovariekarsinomer fra ikke-serøse karsinomer i ovariene (<i>EQS 32996 rev. 1.2</i>).
Analyse relevant for behandling:	Nei

Kategori 4: Bruk av antistoff som er beregnet til forskning i analyse som har direkte betydning for behandling, se Tabell 2:6.

Tabell 2:6 – Eksempel 6, ROS1 antigen

Produktkode:	#3287
Protein/antigen:	ROS1
Antistoff klon:	D4D6
Oppgaven til proteinet i kroppen:	Et gen som koder for et tyrosinkinase (et onkogen) (<i>Takeuchi et al., 2012</i>)
Klinisk relevans:	Det finnes overuttrykk av ROS1 i 1-2% av lungekreft, så antigenet brukes til diagnostisering av dette (<i>Takeuchi et al., 2012</i>).
Analyse relevant for behandling:	Ja

2.2.4. NordiQC (*Nordic Immunohistochemical Quality Control*)

NordiQC er en organisasjon som tilbyr kvalitetssikring av utvalgte protokoller til sine deltakere. En omfattende liste med anbefalinger til protokoller ligger tilgjengelig på NordiQC sin nettside. Laboratorier har mulighet til å delta i disse vurderingene ved at de mottar et snitt fra NordiQC som de skal farge ved å bruke sin egen protokoll. NordiQC vurderer resultatet og gir en tilbakemelding, inkludert bilder med optimale resultater og forslag til forbedringer. Basert på alle innsamlede resultater lager de så anbefalinger som de legger ut på nettsiden.

NordiQC har som målsetting å sikre høy kvalitet på, og utvidet bruk av IHC analyser. Dette gjør de ved å gjennomføre tester, lage anbefalinger for optimaliserte protokoller, og gjøre informasjon lett tilgjengelig.

Nettsiden til NordiQC fungerer som et oppslagsverk hvor man kan søke opp forskjellige antistoff klon som brukes til deteksjon av antigener. På nettsiden finner man hvilken klon og protokoll som ble brukt på analysen, sammen med resultat.

NordiQC brukes som materiale i denne rapporten fordi den benyttes av Enhet for immunhistokjemi til optimalisering av protokollene til sine analyser. I noen tilfeller erstattes protokoll anbefalt av produsent til en protokoll anbefalt av NordiQC. Til rapporten ble det også benyttet informasjon om antigener i rutinediagnostikk hos enheten og klinisk relevans av disse som står på NordicQC sin hjemmeside.

2.2.5. EQS (*Extended Quality System*)

EQS er et kvalitetssystem som benyttes hos St. Olavs hospital. Systemet er tilgjengelig for ansatte ved hjelp av innlogging med adgangskort. I systemet ligger alle prosedyrer som benyttes ved de forskjellige avdelingene, retningslinjer for blant annet vurdering av leverandører, innkjøp av nytt laboratorieutstyr, og prosedyrer til validering av nye metoder. Avvik fra prosedyrene skal meldes inn og bearbeides i EQS. Prosedyrer og andre dokumenter blir revidert ved behov, og dokumentene kan derfor være endret dersom de søkes opp på ulike tidspunkt.

Hver avdeling har sine egne kategorier innen EQS, slik at det er enkelt å finne prosedyrer som er relevante.

På tidspunktet denne rapporten ble skrevet var St. Olavs hospital lukket for studenter. Forfatterne har dermed ikke hatt tilgang til EQS, og har ikke hatt mulighet til å utføre egenvurdering om hvilke dokumenter som er relevante for rapporten. Dokumentene som er brukt i denne rapporten ble tilsendte av veileder etter hennes vurdering. Dette inkluderer planer og rapporter, valg av primærantistoff til utprøving, og kvalitetshåndbok for AP.

2.2.6. *Andre kilder*

Oria er NTNU-biblioteket sitt digitale søkesystem som samler de vitenskapelige artiklene universitetet har tilgang til. Oria ble benyttet i denne rapporten til å samle informasjon som ikke var tilgjengelig fra de andre kildene. Informasjon gjelder hovedsakelig teori om kvalitative forskningsmetoder, og informasjon om antigener som er i et forskningsstadium per i dag. Det er også benyttet lærebok og annet pensum fra bioingeniørutdanning angående teori om IHC og histologi generelt.

3. RESULTATER

3.1. IVDR – Tolkning av utklipp fra regulativet

Alle retningslinjene fra det tidligere direktivet er i utgangspunktet videreført, og hele innholdet er gjengitt med endringer i regulativet. Mesteparten av innholdet er rettet mot produsenter av IVMU, men det inneholder også avsnitt som er spesielt rettet mot helseinstitusjoner. Resultatene som følger er utklipp fra IVDR, sammen med en tolkning på norsk. Utklippene fra IVDR er gitt i *kursiv*.

3.1.1. IVDR – Introduksjon, Punkt 29

IVDR begynner med en introduksjon som punktvis går gjennom hensikt, omfang og gir beskrivelser av innholdet i regulativet. Punkt 29 omhandler helseinstitusjoner, og spesifiserer at det skal være mulig for helseinstitusjoner å produsere og modifisere IVMU som ikke er beregnet til bruk i *industriell skala*. Det er denne intensjonen i regulativet som åpner opp for den fleksibiliteten som trengs ved Enhet for immunhistokjemi for at de skal kunne benytte IVMU slik som de gjør i dag.

(29) Health institutions should have the possibility of manufacturing, modifying and using devices in-house and thereby addressing, on a non-industrial scale, the specific needs of target patient groups which cannot be met at the appropriate level of performance by an equivalent device available on the market. In that context, it is appropriate to provide that certain rules of this Regulation, as regards devices manufactured and used only within health institutions, including hospitals as well as institutions, such as laboratories and public health institutes that support the health care system and/or address patient needs, but which do not treat or care for patients directly, should not apply, since the aims of this Regulation would still be met in a proportionate manner. It should be noted that the concept of 'health institution' does not cover establishments primarily claiming to pursue health interests or healthy lifestyles, such as gyms,

spas, wellness and fitness centres. As a result, the exemption applicable to health institutions does not apply to such establishments.

3.1.2. IVDR – Artikkel 1

Artikkel 1 beskriver hvem regulativet gjelder for, men også unntakene til regulativet, det vil si tilfeller hvor regulativet ikke gjelder. Punkt 3 av artikkel 1 anses som mest relevant for Enhet for immunhistokjemi:

3. This Regulation does not apply to: a) products for general laboratory use or research-use only products, unless such products, in view of their characteristics, are specifically intended by their manufacturer to be used for in vitro diagnostic examination

Enhet for immunhistokjemi bruker antistoff til diagnostikk som er beregnet til forskning. Det vil si at IVDR ikke er relevante for produsenten av produktet sin del, mens det er relevante for Enhet for immunhistokjemi ettersom de bruker disse produktene i analyser der resultater benyttes i diagnostikk.

3.1.3. IVDR – Artikkel 2

Artikkel 2 av IVDR inneholder definisjoner som gjelder for regulativet. Følgende definisjoner er mest relevante for rapporten:

(2) *‘in vitro diagnostic medical device’ means any medical device which is a reagent, reagent product, calibrator, control material, kit, instrument, apparatus, piece of equipment, software or system, whether used alone or in combination, intended by the manufacturer to be used in vitro for the examination of specimens, including blood and tissue donations, derived from the human body, solely or principally for the purpose of providing information on one or more of the following:*

(a) *concerning a physiological or pathological process or state*

- (b) *concerning congenital physical or mental impairments*
- (c) *concerning the predisposition to a medical condition or a disease*
- (d) *to determine the safety and compatibility with potential recipients*
- (e) *to predict treatment response or reactions*
- (f) *to define or monitoring therapeutic measures.*

Specimen receptacles shall also be deemed to be in vitro diagnostic medical devices

In vitro medicinal device er oversatt til in vitro medisinsk utstyr og betegnes som IVMU i rapporten. Noen steder er ordet *produkt* benyttet som oversettelse for *device*.

(12) *'intended purpose' means the use for which a device is intended according to the data supplied by the manufacturer on the label, in the instructions for use or in promotional or sales materials or statements or as specified by the manufacturer in the performance evaluation;*

(14) *'instructions for use' means the information provided by the manufacturer to inform the user of a device's intended purpose and proper use and of any precautions to be taken*

Disse definisjonene er relevante, fordi de beskriver hvordan produsenten mener at IVMU skal benyttes av brukerne. I denne rapporten er *intended purpose* oversatt til tiltenk bruk.

(23) *'manufacturer' means a natural or legal person who manufactures or fully refurbishes a device or has a device designed, manufactured or fully refurbished, and markets that device under its name or trademark*

I rapporten omtales *manufacturer* som produsent.

(29) *'health institution' means an organisation the primary purpose of which is the care or treatment of patients or the promotion of public health*

(30) *'user' means any healthcare professional or lay person who uses a device*

I rapporten omtales *health institution* som helseinstitusjon og *user* som bruker.

(22) *‘putting into service’ means the stage at which a device, other than a device for performance study, has been made available to the final user as being ready for use on the Union market for the first time for its intended purpose;*

I denne rapporten er *putting into service* oversatt til *å ta i bruk*.

3.1.4. IVDR – Artikkel 5

Artikkel 5 inneholder regulativer som gjelder for å slippe IVMU på markedet, og hvordan de skal tas i bruk. Denne artikkelen inneholder også retningslinjer om hvordan helseinstitusjoner skal forholde seg til IVDR ved bruk av in vitro medisinsk utstyr på en måte som er annerledes enn det som er tiltenkt av produsenten. De avsnittene som følger er de som er relevante for helseinstitusjoner i artikkel 5.

Placing on the market and putting into service

1. *A device may be placed on the market or put into service only if it complies with this Regulation when duly supplied and properly installed, maintained and used in accordance with its intended purpose.*

Punkt 1 spesifiserer at in vitro medisinsk utstyr kan gjøres tilgjengelig på markedet, eller tas i bruk dersom det oppfyller kravene satt frem av IVDR. Dette er ikke aktuelt for Enhet for immunhistokjemi da de ikke selger kommersielle reagenser, men er relevant fordi alt som omhandler *å ta produkter i bruk* er gjeldende. Dette spesifiseres i punkt 4 som sier at IVMU benyttet ved helseinstitusjoner skal anses som å være tatt i bruk.

CE-merking på produktet viser at produktet har fått den nødvendige sertifiseringen og er i henhold til IVDR som er produsentens ansvar. Dette er kun gjeldende så lenge bruken av produktet følger produsentens anvisning gjennom mottak, installering, oppbevaring, vedlikehold, bruk og eventuell annen spesifisert bruk av produktet. Helseinstitusjonenes ansvar er dermed å sikre at produktet brukes som angitt av produsenten. Bruk som avviker fra tiltenkt bruk kan gjøre at kravene satt frem av IVDR ikke oppfylles, og ansvaret til å oppfylle disse kravene faller på helseinstitusjonen. Til denne rapporten er Enhet for immunhistokjemi en slik helseinstitusjon

som gjør endringer i sine protokoller, slik at bruk av IVMU er annerledes enn anbefalinger eller tiltenkt bruk satt frem av produsenten.

2. *A device shall meet the general safety and performance requirements set out in Annex I which apply to it, taking into account its intended purpose.*

IVMU som skal tas i bruk skal følge sikkerhet og ytelseskravene satt frem av Annex I i regulativet, se Vedlegg A.

3. *Demonstration of conformity with the general safety and performance requirements shall include a performance evaluation in accordance with Article 56.*

Artikkel 56 i regulativet omhandler ytelsesstudier som et produkt må gjennomgå før det kan selges i markedet. Disse kravene er tiltenkt produsenter, og er dermed ikke relevante til denne rapporten.

4. *Devices that are manufactured and used within health institutions, with the exception of devices for performance studies, shall be considered as having been put into service.*

Punkt 4 definerer at IVMU som er laget og brukes hos helseinstitusjoner skal anses for å være *tatt i bruk*. Dermed må retningslinjene satt frem i IVDR følges som gitt i punkt 1.

5. *With the exception of the relevant general safety and performance requirements set out in Annex I, the requirements of this Regulation shall not apply to devices manufactured and used only within health institutions established in the Union, provided that all of the following conditions are met:*

Punkt 5 spesifiserer unntak der IVDR ikke vil være gjeldende for IVMU som produseres og brukes innen helseinstitusjoner, gitt at en liste med krav oppfylles. Dette gjelder ikke Annex I som må følges i ethvert tilfelle. Alle følgende krav skal være oppfylt for at punkt 5 skal kunne gjelde:

(a) *the devices are not transferred to another legal entity;*

IVMU kan ikke overføres til en annen juridisk enhet. Antistoffene hos enheten forlater ikke avdelingen etter at de er mottatt og brukt, så dette punktet regnes som oppfylt.

(b) *manufacture and use of the devices occur under appropriate quality management systems;*

IVMU skal benyttes under skikkelig kvalitetssystemer. *Kvalitetshåndbok Avdeling patologi (AP) EQS dokument 24616* beskriver hvilke kvalitetssystem som er på plass hos avdeling per i dag. Kvalitetshåndboken er utarbeidet i tråd med EN ISO 15189. Vurdering av kvaliteten på kontrollsystemet gjennomføres også under akkreditering av laboratorier.

(c) *the laboratory of the health institution is compliant with standard EN ISO 15189 or where applicable national provisions, including national provisions regarding accreditation;*

Laboratoriet skal oppfylle kravene i EN ISO 15189 eller andre gjeldende lokale akkrediteringer. AP har levert søknad om EN ISO 15189 akkreditering ifølge veileder. Dette punktet vil være innfridd ved innførelse av IVDR. Akkreditering i henhold til EN ISO 15189 stiller krav til generell kvalitet på laboratoriet og deres kvalitetssystem. (*ISO - International Organization for Standardization, 24.04.2020*).

(d) *the health institution justifies in its documentation that the target patient group's specific needs cannot be met, or cannot be met at the appropriate level of performance by an equivalent device available on the market;*

Helseinstitusjonen skal kunne dokumentere at behov for noen pasientgrupper ikke kan oppfylles på en tilfredsstillende måte ved bruk av IVMU tilgjengelig på markedet. Det må kunne rettferdiggjøres at det vil være nødvendig å endre eller produsere et produkt for å kunne dekke dette behovet. Dette punktet er relevant for Enhet for immunhistokjemi, ettersom de tester forskjellige protokoller som endrer produkter, slik at fargekvalitet forbedres i noen analyser.

(e) the health institution provides information upon request on the use of such devices to its competent authority, which shall include a justification of their manufacturing, modification and use

Institusjoner skal kunne fremvise dokumentasjon om bruk av IVMU som omtalt i punkt *d* til en *kompetent autoritet* ved forespørsel. Legemiddelverket er fag- og tilsynsmyndighet i Norge for medisinsk utstyr, og vil dermed ta denne rollen. AP registrerer egenutviklede reagenser og metoder til Statens Legemiddelverk som en del av kvalitetssikringsprosedyre (EQS 24616, rev. 2.13).

(f) the health institution draws up a declaration which it shall make publicly available, including:

- (i) the name and address of the manufacturing health institution,*
- (ii) the details necessary to identify the devices,*
- (iii) a declaration that the devices meet the general safety and performance requirements set out in Annex I to this Regulation and, where applicable, information on which requirements are not fully met with a reasoned justification therefor;*

Institusjonene skal lage en offentlig tilgjengelig erklæring som skal inneholde navnet og adressen til helseinstitusjonen samt detaljer som er nødvendig for å identifisere de aktuelle produktene. I tillegg skal den inneholde en erklæring som beviser at sikkerhetskravene satt frem av Annex I er oppfylt, og eventuell begrunnelse dersom det finnes avvik fra disse.

(g) as regards class D devices in accordance with the rules set out in Annex VIII, the health institution draws up documentation that makes it possible to have an understanding of the manufacturing facility, the manufacturing process, the design and performance data of the devices, including the intended purpose, and that is sufficiently detailed to enable the competent authority to ascertain that the general safety and performance requirements set out in Annex I to this Regulation are met. Member States may apply this provision also to class A, B or C devices in accordance with the rules set out in Annex VIII;

Dette punktet omhandler IVMU som faller innenfor D-risiko klassifisering. Siden eksemplene i denne rapporten klassifiseres som C-risiko, anses dette punktet som irrelevant. Kravene i dette punktet kan innføres for de øvrige klassene dersom Norsk lovgivning angir dette.

(h) the health institution takes all necessary measures to ensure that all devices are manufactured in accordance with the documentation referred to in point (g); and

Dette punktet omtaler punkt g videre.

(i) the health institution reviews experience gained from clinical use of the devices and takes all necessary corrective actions.

Helseinstitusjonene skal gjennomgå erfaringene som opparbeides gjennom klinisk bruk og gjøre nødvendige korreksjoner.

Member States may require that such health institutions submit to the competent authority any further relevant information about such devices which have been manufactured and used on their territory. Member States shall retain the right to restrict the manufacture and use of any specific type of such devices and shall be permitted access to inspect the activities of the health institutions.

This paragraph shall not apply to devices that are manufactured on an industrial scale.

Myndighetene i hvert medlemsland kan kreve at helseinstitusjoner sender inn dokumentasjon med enhver eventuell tilleggsinformasjon om anvendt egenprodusert IVMU til en kompetent autoritet. I tillegg skal myndighetene ha tilgang til å inspisere aktiviteten hos helseinstitusjonen, og har rett til å stoppe produksjon og bruk av slikt utstyr.

3.2. Antistoff

Informasjon om antistoff gitt i produsentens pakningsvedlegg er sammenlignet med tilsvarende informasjon hentet fra valideringsrapport fra Enhet for immunhistokjemi og presentert i Tabell 3:1–Tabell 3:6

3.2.1. *Eksempel 1: CD163*

Her er det avvik ved bruk av deteksjonssystemet. Enhet for immunhistokjemi bruker Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit mens produsenten spesifiserer at antistoffet skal brukes sammen med Novolink™ Polymer Detection Systems fra Leica Biosystems. Det ble bestemt på enheten at alle IHC analysene med unntak av de som har betydning for behandling skal benytte OptiView deteksjonssystem. I valideringsrapporten er det ikke referert til produsentens spesifiserte deteksjonssystem og kommentarer fra laboratoriet bekrefter at dette ikke er testet.

Det er også avvik på forbehandlingsreagens som benyttes til analyse. Pakningsvedlegget spesifiserer Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6. Enhet for immunhistokjemi benytter forbehandlingsbufferen CC1 som har en pH 8 – 8.5 (*EQS 28966, rev. 2.1*). Dette er en standard buffer som benyttes sammen med BenchMark Ultra.

Det står i pakningsvedlegget at dersom antistoffet skal benyttes med andre systemer enn det som er spesifisert, må dette valideres. Dette er utført av enheten, men en begrunnelse for valget mangler i dokumentasjonen.

Tabell 3:1 viser resultatene for antistoff mot CD163.

Tabell 3:1 – CD163 Liquid Mouse Monoclonal Antibody, sammenligning mellom data fra produsent og bruk hos AP

Data:	Produsentens pakningsvedlegg:	Valideringsrapport fra AP:
Produkt:	Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD163	Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD163
Produsent:	Leica Biosystems	Leica Biosystems
Klon:	10D6	10D6
Spesifisitet:	Human CD163 antigen	Human CD163 antigen
Tiltenkt bruk:	In vitro diagnostikk	Verifisert til rutinediagnostikk
Konsentrat / RTU:	Konsentrat	Konsentrat
Anbefalt bruk:		
Forbehandling:	<i>HIER</i> : Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6	CC1, 32 min
Anbefalt fortykning:	1:200 for 30 min @ 25 °C	1:200, 32 min
Deteksjonssystem:	Novolink™ Polymer Detection Systems	Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit
Prøveforberedelser:	10% formalinfiksert, parafinstøpt vev.	Formalinfixert, parafinstøpt vev.
Positiv vevskontroll:	Placenta	Mb1-kontroll, inneholder appendiks, lever, pankreas og tonsill. Ikke spesifisert om positiv eller negativ kontroll
Negativ vevskontroll:	Skjelettmuskulatur	Mb1-kontroll, inneholder appendiks, lever, pankreas og tonsill. Ikke spesifisert om positiv eller negativ kontroll

Kommentar:	NCL-L-CD163 anbefales til vurdering av CD163 proteinuttrykk i normalt og neoplastisk vev.	Vevstyper antistoffet er testet ut på: Tonsill, beinmarg, granulær-celletumor, kronisk myelomonocytisk leukemi (KMML), akutt myelogen leukemi (AML) med monocyttdifferensiering, Rosai Dorfman sykdom
------------	---	---

3.2.2. Eksempel 2: CDX-2

Her er det avvik ved bruk av deteksjonssystemet. Enhet for immunhistokjemi bruker Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit, mens produsenten anbefaler at antistoffet skal brukes sammen med HiDef Detection™ HRP Polymer System eller HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System fra Cell Marque. Kravet i pakningsvedlegget er at det skal brukes et HRP- (horseraddish peroksidase) eller Alk Phos-koblet deteksjonssystem. Dette er oppnådd ved bruk av Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit som er HRP-koblet. I valideringsrapporten er det ikke referert til produsentens spesifiserte deteksjonssystem. Kommentar fra laboratoriet bekrefter at dette ikke er testet, men at CellMarque har et samarbeid med Ventana/Roche som bekrefter at antistoffene skal fungere bra sammen med deteksjonssystemet fra Roche og BenchMark Ultra.

Her er det også spesifisert et annet forbehandlingsreagens av produsenten enn det som er benyttet, samme begrunnelse som i eksempel 1 er gitt også her. Produsenten anbefaler HIER. Epitop-hentingsreagens: Trilogy men enheten benytter forbehandlingsbufferen CC1 som har en pH 8 – 8.5.

Det står i pakningsvedlegg at dersom antistoffet skal benyttes med andre systemer enn det som er spesifisert må dette valideres. Dette er utført av enheten, men begrunnelse for valgene som avviker mangler i dokumentasjonen.

Tabell 3:2 viser resultatene for antistoff mot CDX-2.

Tabell 3:2 – CDX-2, Rabbit Monoclonal Primary Antibody- sammenligning mellom data fra produsent og bruk hos AP.

Data:	Produsentens pakningsvedlegg:	Valideringsrapport fra AP:
Produkt:	CDX-2 Rabbit Monoclonal Primary Antibody	CDX-2 Rabbit Monoclonal Primary Antibody
Produsent:	Cell Marque RabMAb	Cell Marque RabMAb
Klon:	EPR2764Y	EPR2764Y
Spesifisitet:	CDX-2	CDX-2
Tiltenkt bruk:	In vitro diagnostikk	Verifisert til rutinediagnostikk
Konsentrat / RTU:	Konsentrat	Konsentrat
Anbefalt bruk:		
Forbehandling:	HIER. Epitop-hentingsreagens: Trilogy	CC1, 64 min
Anbefalt fortynning:	1:100 – 1:500, 10 – 30 min	1:100, 32 min
Deteksjonssystem:	HRP- eller Alk Phos-koblet deteksjonssystem. HiDef Detection™ HRP Polymer System eller HiDef Detection™ Alk Phos Polymer System deteksjonssett er anbefalt, men ikke uttrykkelig påkrevd.	Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit
Prøveforberedelser:	(10%) Formalinfiksert, parafinstøpt vev.	Formalinfiksert, parafinstøpt vev.
Positiv vevskontroll:	Tykkttarm med kjerner.	Mb1-kontroll, inneholder appendiks, lever, pankreas og tonsill. Ikke spesifisert hva som er positiv og hva som er negativ kontroll.

Negativ vevskontroll:	Type ikke spesifisert, må valideres av bruker.	Mb1-kontroll, inneholder appendiks, lever, pankreas og tonsill. Ikke spesifisert hva som er positiv og hva som er negativ kontroll.
Kommentar:	Anbefalt bruk med reagenser som spesifiser, bruk med andre reagenser må testes og dokumenteres.	Utprøving av konsentrasjon, forbehandling og tid tar utgangspunkt i produsenten og NordiQC sine anbefalinger.

3.2.3. Eksempel 3: H3G34W

Dette antistoffet er kun beregnet for bruk til forskning fra produsentens side. Dette produktet trenger derfor ikke å tilfredsstillere kravene i IVDR i henhold til artikkel 1 pkt. 3(a). Produktet er derfor ikke sertifisert, og mangler CE-merket. Avvik fra produsentens anbefalinger av enheten er derfor ikke interessant med tanke på å oppfylle kravene i IVDR.

Bruken av dette produktet må oppfylles ved å dokumentere at det ikke finnes et sertifisert produkt tilgjengelig på markedet som kan dekke samme behov. Valideringsrapporten spesifiserer at dette antistoffet kun er beregnet til forskning, og at det skal brukes til diagnostikk ved enheten på grunn av behov for markøren for å forhindre forsinket kreftdiagnostikk. Derimot kommer det ikke frem eksplisitt i rapporten at dette antistoffet ikke er tilgjengelig på markedet for diagnostisk bruk.

Tabell 3:3 viser resultatene for antistoff mot H3G34W.

Tabell 3:3 – H3G34W, Rabbit Monoclonal Antibody, sammenligning mellom data fra produsent og bruk hos AP

Data:	Produsentens pakningsvedlegg:	Valideringsrapport fra AP:
Produkt:	Anti-Histone H3.3 G34W Rabbit Monoclonal Antibody	Anti-Histone H3.3 G34W Rabbit Monoclonal Antibody
Produsent:	RevMab	RevMab
Klon:	RM263	RM263
Spesifisitet:	H3G34W	H3G34W
Tiltenkt bruk:	Forskning	Validert til rutinediagnostikk
Konsentrat / RTU:	Konsentrat	Konsentrat
Anbefalt bruk:		
Forbehandling:	Ikke spesifisert	CC1, 64 min
Anbefalt fortykning:	1:100 – 1:200	1:2000
Deteksjonssystem:	Ikke spesifisert	Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit
Prøveforberedelser:	(10%) Formalinfiksert, parafinstøpt vev.	Formalinfiksert, parafinstøpt vev.
Positiv vevskontroll:	Ikke spesifisert	Kjempecelletumor og kondroblasom. Ikke spesifisert hva som er positiv og hva som er negativ kontroll
Negativ vevskontroll:	Ikke spesifisert	Kjempecelletumor og kondroblasom. Ikke spesifisert hva som er positiv og hva som er negativ kontroll

Kommentar:	Antistoff kun beregnet til forskning og det følger dermed ikke med anbefalt protokoll til reagenset.	Det er behov for denne markøren til diagnostikk av kjempecelletumor. Implementering av denne markøren forhindrer forsinket kreftdiagnostikk.
------------	--	--

3.2.4. Eksempel 4: PAX5

Her er det avvik ved bruk av deteksjonssystemet. Enheten benytter deteksjonssystemet fra samme produsent, men bruker en annen type enn det som står i pakningsvedlegget til antistoffet. Det ble bestemt på enheten at alle IHC analysene med unntak av de som har betydning for behandling skal benytte OptiView deteksjonssystem. I valideringsrapporten er det ikke referert til produsentens spesifiserte deteksjonssystem og kommentarer fra laboratoriet bekrefter at dette ikke er testet.

Tabell 3:4 viser resultatene for antistoff mot PAX5.

Tabell 3:4 – PAX 5 Rabbit Monoclonal Primary Antibody- sammenligning mellom data fra produsent og bruk hos AP.

Data:	Produsentens pakningsvedlegg:	Valideringsrapport fra AP:
Produkt:	CONFIRM anti-PAX5, Rabbit Monoclonal Primary Antibody	CONFIRM anti PAX5, Rabbit Monoclonal Primary Antibody
Produsent:	Ventana	Cell Marque
Klon:	SP34	SP34
Spesifisitet:	PAX5	PAX5
Tiltenkt bruk:	In vitro diagnostikk	Verifisert til in vitro diagnostikk
Konsentrat / RTU:	RTU	RTU

Anbefalt bruk:		
Forbehandling:	Cell Conditioning 1 (CC1), 64 min.	CC1, 32 min.
Anbefalt fortynning:	Ingen fortynning.	Ingen fortynning
Deteksjonssystem:	UltraView Universal DAB Detection Kit	Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit
Prøveforberedelser:	10% Formalinfiksert, parafinstøpt vev.	Formalinfiksert, parafinstøpt vev.
Positiv vevskontroll:	Eksempler på positiv vevskontroll for dette antistoffet er normal tonsill og milt.	Mb1-kontrollen som inneholder appendiks, lever, pankreas og tonsill. Ikke spesifisert hva som er positiv og hva som er negativ kontroll.
Negativ vevskontroll:	Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. Nr. 790-4795 / 06683380001)	Mb1-kontrollen som inneholder appendiks, lever, pankreas og tonsill. Ikke spesifisert hva som er positiv og hva som er negativ kontroll.
Kommentar:	Begrensninger: Dette antistoffet kan demonstrere ikke-spesifikk cytoplasmatisk farging i endotelceller.	Protokollen tar utgangspunkt i anbefalinger fra produsenten.

3.2.5. Eksempel 5: WT1

Bruk av antistoff avviker fra det som er anbefalt av produsenten når det kommer til forbehandling med CC1 sammen med enzymet protease, inkubasjonstid av antistoff og prøven, og bruk av amplifisering i analyse. Produsenten anbefaler forbehandling med CC1 i 32 minutter,

mens enheten bruker 64 minutter i kombinasjon med enzymet protease. Anbefalt inkubasjonstid av antistoff og prøve er 32 minutter, mens enheten bruker 16 minutter. Til slutt benytter enheten amplifisering sammen med analyse, og dette er ikke anbefalt av produsenten. Amplifisering benyttes til å øke intensiteten av farge ved bruk av mus og kanin primærantistoff (*OptiView Amplification Kit*, 24.04.2020.).

I valideringsrapporten står det at valg av forbehandlingsprosedyre og amplifisering tar utgangspunkt i anbefalinger fra NordiQC, men det inkluderer ikke en sammenligning av protokoll fra NordiQC med det som er anbefalt av produsent.

Tabell 3.5 viser resultatene for antistoff mot WT1.

Tabell 3:5 – WT1 Mouse Monoclonal Antibody- sammenligning mellom data fra produsent og bruk hos AP.

Data:	Produsentens pakningsvedlegg:	Valideringsrapport fra AP:
Produkt:	WT1 (6F-H2) Mouse Monoclonal Antibody	WT1 (6F-H2) Mouse Monoclonal Antibody
Produsent:	Cell Marque / Ventana	Ventana, Roche
Klon:	6F-H2	6F-H2
Spesifisitet:	WT1	WT1
Tiltenkt bruk:	In vitro diagnostikk	Verifisert til in vitro diagnostikk
Konsentrat / RTU:	RTU	RTU
Anbefalt bruk:		
Forbehandling:	CC1 32 min	CC1, 64 min. Protease 34 min før inkubasjon med RTU antistoff.
Anbefalt fortynning:	Ikke fortynnet, inkubasjon 32 min @ 37°C	Ikke fortynnet, inkubasjon 16 min.

Deteksjonssystem:	Ventana UltraView Universal DAB Detection Kit eller OptiView DAB IHC Detection Kit	Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit
Prøveforberedelser:	Formalinfiksert, parafin-innstøpt vev	Formalinfiksert, parafinstøpt vev.
Positiv vevskontroll:	Serøst ovarialkarsinom, mesoteliom, nyre, testikkel.	MB7 som inneholder, hud, nyre, tube og serøst adenokarsinom. Ikke spesifisert hva som er positiv og hva som er negativ kontroll.
Negativ vevskontroll:	Ikke spesifisert	MB7 som inneholder, hud, nyre, tube og serøst adenokarsinom. Ikke spesifisert hva som er positiv og hva som er negativ kontroll.
Kommentar:	WT1 monoklonalt antistoff fra mus beregnet til påvisning av WT1-proteinet i formalinfiksert, parafin innstøpte vev.	Amplifisert 4+4 min (dilution linker og multimer) benyttes i analysen basert på anbefaling fra NordiQC.

3.2.6. Eksempel 6: ROS1

Dette antistoffet er kun beregnet for bruk til forskning fra produsentens side. Dette produktet trenger derfor ikke å tilfredsstillende kravene i IVDR i henhold til artikkel 1 pkt. 3(a). Produktet er derfor ikke sertifisert, og mangler CE-merket. Avvik fra produsentens anbefalinger av enheten er derfor ikke interessant med tanke på å oppfylle kravene i IVDR. Enhet for

immunhistokjemi er i prosessen med å validere dette produktet for bruk på avdelingen og derfor er ikke en endelig valideringsrapport tilgjengelig.

I valideringsplanen står det at antistoffet kun er beregnet til forskning, men benyttes til diagnostikk når validering er ferdig utført. Bruken av dette produktet må oppfylles ved å dokumentere at det ikke er et sertifisert produkt tilgjengelig på markedet som kan dekke samme behov.

Tabell 3:6 viser resultatene for antistoff mot ROS1.

Tabell 3:6 – ROS1 Rabbit monoclonal antibody, sammenligning mellom data fra produsent og bruk hos AP.

Data:	Produsentens pakningsvedlegg:	Valideringsplan fra AP:
Produkt:	ROS1 (D4D6 [®]) Rabbit monoclonal antibody	ROS1 (D4D6 [®]) Rabbit monoclonal antibody
Produsent:	Cell Signaling Technology/Bionordika	Cell Signaling Technology/Bionordika
Klon:	D4D6	D4D6
Spesifisitet:	ROS1	ROS1
Tiltenkt bruk:	Forskning	Validering til in vitro diagnostikk pågår.
Konsentrat / RTU:	Konsentrat	Konsentrat
Anbefalt bruk:		Utgangspunkt for utprøvelse (antistoff er i verifisering prosessen):
Forbehandling:	EDTA unmasking solution, protokoll må utarbeides for det instrumentet som brukes.	CC1, 64 min.
Anbefalt fortynning:	1:250	1:50 og 1:100, 32 min inkubasjonstid

Deteksjonssystem:	SignalStain [®] Boost IHC Detection Reagents	Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit Amplifikasjon; uten, 4 min og 8 min.
Prøveforberedelser:	Formalinfiksert, parafinstøpt vev.	Formalinfiksert, parafinstøpt vev.
Positiv vevskontroll:	Ikke angitt	Må testes
Negativ vevskontroll:	Ikke angitt	Må testes
Kommentar:	Antistoff er kun beregnet til forskning.	I en periode vil det bli gjort immunfarging og FISH parallelt, på grunn av at man ikke vet om positive prøver man kan teste ut antistoffet på.

4. DISKUSJON

4.1. Begrensninger

Siden Norge ikke er et fullverdig medlem av EU, foreligger ikke regulativet på norsk. Denne rapporten har derfor benyttet den engelske versjonen av IVDR som ligger tilgjengelig på EU sine nettsider. Oversettelse kan føre til at språk forandrer seg til en viss grad slik at tekster blir endret, men språket er forsøkt ivaretatt slik at innholdet forblir det samme som i det opprinnelige regulativet. De originale uttrykkene på engelsk er inkludert for å vise hvilke oversettelser som er gjort.

Tolkning av IVDR slik det er brukt i denne rapporten er en “lekmannstolkning” i den forstand at forfatterne ikke har juridisk bakgrunn. Det er brukt juridisk språk i lovteksten, men oversettelsene til norsk er ikke preget av jusspråk. Dette kan føre til at krav kan fremstå mer eller mindre strenge enn i IVDR.

Denne rapporten er skrevet uten at forfatterne har hatt tilgang til laboratoriet eller kvalitetssystemet EQS. Dette har ført til begrensninger på tilgang til dokumentasjon, og dokumentasjonen som er benyttet er utvalgt og tilsendt av veileder. Dette betyr at forfatterne ikke har hatt mulighet til å gjøre egne vurderinger på hvilke EQS-dokumenter som er relevante for rapporten. De har heller ikke hatt anledning til å observere analysene som er diskutert i rapporten. Dette kan ha ført til at viktig kunnskap og erfaring ikke er tatt med. Det har heller ikke vært tilgang til brukermanualer og annen informasjon som eventuelt utelukkende finnes i papirformat i laboratoriet.

Anbefalingene som følger diskuterer hvorvidt enheten kan bruke antistoffeksemplene slik de gjør per i dag, eller om de må gjøre endringer. Forfatterne av denne rapporten er bioingeniørstudenter, og erfaringsnivået bør tas hensyn til slik at endringer ikke implementeres basert på denne rapporten alene.

Begrunnelsene fra Enhet for immunhistokjemi, som er innsamlet i denne rapporten, kommer fra veileder som til daglig jobber med IHC protokollene hos enheten. Fordi det kun har

vært kontakt med en person som jobber hos enheten, er det viktig å nevne at informasjon fra utelukkende én kilde kan gi et snevert innblikk i en prosess. Dette er fordi man kun lener seg på erfaringer fra denne ene personen. Bias vil også kunne forekomme og det har ikke vært mulig å følge opp dette i denne rapporten.

IVDR har en prøveperiode på fem år og er ikke gjeldende før 25. mai 2022. Også produsenter må gjennomgå sine prosedyrer og dokumentasjon og oppdatere i henhold til de nye reglene innen denne fristen. Det betyr at det vil kunne komme endringer fra produsentene angående informasjonen om antistoff som er brukt i denne rapporten.

4.2. Generelle anbefalinger

Det ble forsøkt å finne begrunnelsene for avvikene som er avdekket ved bruken av antistoff ved Enhet for immunhistokjemi, som beskrevet i Tabell 3:1–Tabell 3:6. Det er ulike årsaker til disse avvikene, men dokumentasjon som beskriver disse er manglende. Begrunnelsene fra enheten er derfor skaffet gjennom personlig korrespondanse med veileder, og presenteres i *kursiv*. Valg av protokoller gjøres på grunnlag av empiriske forsøk under validering av nye analyser hos enheten. Denne empiriske fremgangsmåten er vanlig å benytte for laboratorier som gjør immunhistokjemiske analyser, dette på grunn av alle utfordringene som er gjeldene for metoden. Empirisk testing av protokoller brukes for å sikre pålitelige og tydelige resultater, men dette fører også til at det kan bli avvik fra produsentenes anbefalinger.

Vurderingene av eksemplene gjøres først basert på kategoriene, så vurderes hvert antistoff hver for seg med sin begrunnelse. Deretter ses dette i sammenheng med kravene satt frem av IVDR. Generelt sett vil en del endringer kunne godkjennes som unntak til IVDR som beskrevet i artikkel 5, punkt 5. Utfordringen er at det ikke finnes dokumentasjon som begrunner disse endringene. Noen av endringene ble utført med bakgrunn i erfaring, og det er kun gitt en muntlig forklaring som begrunnelse. Artikkel 5, punkt 5 spesifiserer at avvik må begrunnes på en slik måte at de kan fremvises til en kompetent autoritet, som i dette tilfelle er Statens Legemiddelverk eller en annen utnevnt part. Uten slik dokumentasjon kan det ikke bevises at endringene som er utført var nødvendig på det tidspunktet da endringene skjedde.

Siden IHC metode dreier seg om å kunne farge markører av interesse med lite til null interferens fra bakgrunnsstøy, er god fargekvalitet avgjørende for metoden. Dette betyr at bedre fargekvalitet kan brukes som begrunnelse av enheten når de endrer protokoller fra det som er anbefalt av produsenten. Samtidig må enheten dokumentere at de har testet protokollen fra produsenten, slik at de kan bevise at egenutviklet protokoll har bedre resultater.

En stor begrensning ved praksisen til Enhet for immunhistokjemi er at det benyttes én type instrument og at dette ikke er et åpent system. Dette fører til at enheten må benytte reagenser som er ment til bruk med dette systemet for at det ikke skal bli avvik fra instrumentets tiltenkte bruk. Bruk av andre reagenser enn de reagensene som er anbefalt til bruk sammen med instrumentet vil være brudd på IVDR. Dette avviket vil kunne løses ved å anskaffe andre typer instrumenter, selv om dette vil kreve en betraktelig investering både økonomisk, materielt og med tanke på kompetanse.

Det står i artikkel 5, punkt 5-1 i IVDR at helseinstitusjoner skal gjøre korrigerende arbeid. Dette kan medføre at en del analyser må gjennomgås på nytt der nye antistoff som ikke var tilgjengelig på markedet før, testes. Dette gjøres for å sikre at enheten leverer så gode resultater som mulig og at det kan dokumenteres.

For å sikre at informasjon fra produsenter er oppdatert bør enheten ha dialog med sine leverandører slik at de kan bekrefte om, eller når informasjonen er oppdatert i henhold til IVDR. Det må antas at det kan forekomme endringer i informasjonen gitt i eksemplene som er gjennomgått i denne rapporten.

4.3. Gjennomgang og anbefalinger til eksemplene

Kategori 1: Analyse der man bruker konsentrert primærantistoff som fortynnes på laben.

Denne kategorien inneholder reagenser som kjøpes som konsentrat fra produsenten og fortynnes på laben. Fortynningene som er oppgitt i valideringsrapporten er utført innenfor anbefalt fortynningsområde, og denne praksisen vil dermed ikke påvirkes av IVDR.

Eksempel 1: CD163 - Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD163. Bruker annen forbehandlingsprosedyre og et annet deteksjonssystem enn det som er anbefalt av produsent.

Begrunnelse for endringer av veileder:

“For CD163, klon 10D6, brukes det et konsentrat fra Leica Novocastra med tiltenkt bruk til in vitro diagnostikk. I produsentens dokumentasjon er det Leica sitt deteksjonssystem som er spesifisert, ikke Ventana-systemet som vi bruker på enheten. Det ble testet ut to antistoffkloner, en fra Leica og en fra CellMarque. Den valgte klonen ble valgt på grunn av best fargekvalitet og den finnes ikke som RTU på Ventana-systemet. Patologen ønsket også å teste denne klonen. Det ble ikke vurdert å teste ut RTU antistoff, og dermed kjøpes antistoff som konsentrat.”

Forbehandlingsprosedyren til enheten bruker CC1-reagenset til å gjenopprette epitoper men produsenten anbefaler bruk av Leica sitt eget HIER-reagens. OptiView som brukes til å synliggjøre reaksjon er fra produsenten Ventana, mens det anbefales å bruke Leica sitt deteksjonssystem.

- CC1 forbehandlingsreagens er beregnet for bruk sammen med instrumentet BenchMark Ultra fra produsenten Roche, som brukes til immunfarging hos enheten. Bruk av dette reagenset er i tråd med det som anbefales av produsenten til instrumentet men ikke anbefalingene til produsenten av antistoff.
- Enheten bruker klon fra Leica på grunn av bedre fargekvalitet, dette klonet er beregnet til bruk med Leica sitt deteksjonssystem. Enheten bruker OptiView som deteksjonssystem men det finnes ikke en dokumentert begrunnelse for valg dette. Det anbefales at enheten tester deteksjonssystemet fra Leica og sammenligner med resultater ved bruk av deteksjonssystemet fra Ventana. Dette krever bruk av et instrument som er kompatibelt med Leica sitt deteksjonskit. Dersom resultatene ved bruk av OptiView er bedre kan dette da dokumenteres slik at enheten kan fortsette med analyseoppsettet de bruker i dag.

Eksempel 2: CDX-2 Kanin monoklonalt primært antistoff. Konsentratet er fra CellMarque som ikke er beregnet til bruk med OptiView. Forbehandling med CC1 reagens er også annerledes enn det som er anbefalt av produsenten av antistoff.

Begrunnelse fra veileder:

“Det ble ikke testet ut RTU antistoff fra Ventana i dette tilfelle heller, men Cell Marque har et samarbeid med Ventana/Roche og vi vet derfor at disse antistoffene fungerer bra på våre instrumenter.”

- CC1 forbehandlingsløsning er beregnet for bruk med Roche som er produsenten av det automatiserte instrumentet BenchMark Ultra, som brukes til immunfarging hos enheten. Bruk av dette reagenset er i tråd med det som anbefales av produsenten til instrumentet men ikke i tråd med anbefalingene til produsenten av antistoff.
- Her anbefales det å teste ut RTU antistoff fra Ventana som er beregnet til bruk med instrumentet BenchMark Ultra og dermed også OptiView. Deretter kan enheten sammenligne resultatene. Etter sammenligning kan enheten bruke den kombinasjonen av antistoff og deteksjonssystem som anses å gi best fargekvalitet. Et annet alternativ kan være å ta kontakt med Ventana/Roche og få bekreftet med dokumentasjon at det kan brukes Cell Marque sine reagenser sammen med instrumentet grunnet samarbeidet Cell Marque har med Roche/Ventana. Dette kan dessuten hjelpe produsenten å oppdatere sine anbefalinger.

Kategori 2: Bruk av antistoff som kun er beregnet til forskning.

Antistoff i denne kategorien er ikke beregnet for bruk til diagnostikk fra produsentens side. Dermed er ikke produktet CE-merket. Enheten har validert dette antistoffet til diagnostikk fordi det ikke finnes et alternativ på markedet som kan dekke pasientenes behov.

Eksempel 3: H3G34W- Rabbit Monoclonal Antibody. Brukes til in vitro diagnostikk, men produsenten anbefaler bruk av dette antistoff til forskning.

Begrunnelse fra veileder:

“Finnes ikke noe alternativ som er beregnet til in vitro diagnostikk.”

- I både avsnitt 29 og artikkel 5.5. av IVDR står det at helseinstitusjoner kan benytte IVMU reagenser annerledes enn det som er tiltenkt brukt fra produsenten dersom det ikke

finnes noe annet på markedet som gir tilsvarende resultat. Resten av kravene i artikkel 5.5. må likevel oppfylles for at enheten skal bruke dette antistoffet i sine analyser.

Kategori 3: Analyser der det brukes RTU primærantistoff, men protokollen er endret og produsenten sine anbefalinger ikke følges.

Denne kategorien inneholder to eksempler av antistoff der protokollen er endret fra det som er anbefalt, grunnet dårligere kvalitet ved bruk av protokoll fra produsenten. Her bør protokoll som er anbefalt av produsenten testes for begge eksemplene slik at resultatene kan sammenlignes.

Eksempel 4: PAX5 Kanin monoklonale primært RTU antistoff. Protokollen er endret og følger ikke anbefalingen fra produsenten. Her brukes det OptiView deteksjonssystem i stedet for UltraView som er anbefalt. Forbehandlingstid med CC1 er også endret fra 64 minutter til 32 minutter.

Begrunnelse fra veileder:

“Vi har valgt å gå for OptiView deteksjonssystemet på alle antistoff, med unntak av ER, PGR og HER2 siden disse har direkte betydning for behandling, og anbefalingene er UltraView. I resten av analysene bruker vi OptiView.”

- Forbehandlingstid med CC1 ble utprøvd ved både 64 minutter og 32 minutter. Produsenten anbefaler forbehandling ved 64 minutter, men bedre resultater ble oppnådd ved 32 minutter. Begrunnelse for denne endringen er dokumentert i valideringsrapporten og dermed bør denne praksisen være godkjent i henhold til kravene satt frem av IVDR.
- Seksjonsleder, spesialbioingeniør og fagansvarlig bioingeniør ved Enhet for immunhistokjemi har bestemt at OptiView skal brukes som deteksjonssystem for alle analyser. Begrunnelsene for dette er at Roche anbefaler dette, men det finnes ikke dokumentasjon hvor dette står eksplisitt. OptiView velges også på grunn at den har bedre sensitivitet enn UltraView, noe som stemmer med hva som står i reagensvedlegget til deteksjonssystemene. Siden det finnes ikke noe dokumentasjon for å begrunne valg av

OptiView kit over UltraView, anbefales det å teste begge metodene og sammenligne resultater. Dersom det kan dokumenteres at OptiView er det beste valget, kan bruk av dette fortsette gitt at dokumentasjonskravene i artikkel 5.5 oppfylles. Enheten kan også ta kontakt med Roche og få bekreftet at valg av OptiView til denne analyse er anbefalt, slik at Roche kan oppdatere sine anbefalinger dersom det er aktuelt.

Eksempel 5: WT1- Mouse Monoclonal Antibody. Protokoll endres fra det som er anbefalt fra produsenten og tar utgangspunkt i anbefalinger fra NordiQC. Enzymet protease brukes i forbehandlingsprosedyren og inkubasjonstid er annerledes enn det som er anbefalt av produsenten. Til slutt benyttes det amplifisering ved analyse.

Begrunnelse fra veiledere:

“Man får ikke optimalt fargeresultat av å bruke den protokollen som anbefales fra produsent, og derfor har enheten endret den. Brukt etter anbefalinger fra NordiQC.”

- Her er endring i protokollen utført basert på anbefalinger fra NordiQC. NordiQC er i prosessen med å få ISO akkreditering. Siden protokollen fra produsenten ble testet og det ikke ble oppnådd ønskede resultater, kan denne endringen beholdes hos enheten ifølge artikkel 5 av IVDR gitt at dokumentasjonskravet i artikkel 5.5 oppfylles..

Kategori 4: Bruk av antistoff som er beregnet til forskning i analyse som har direkte betydning for behandling. Ved positive funn blir det gjort FISH (fluorescens in situ hybridisering) analyse for å bekrefte funn.

Denne kategorien inneholder et eksempel på et antistoff som har direkte betydning for behandling, men resultatene bekreftes ved FISH-analyse. FISH er en dyrere analyse som visualiserer gener i preparater, og denne analysen utføres hos Enhet molekylærpatologi.

Eksempel 6: ROS1 Kanin monoklonalt antistoff. Dette antistoffet er kun beregnet til forskning fra produsenten sin side og bærer dermed ikke CE-merket.

Begrunnelse:

“Det er kommet et RTU antistoff fra Ventana/Roche på markedet etter at vi implementerte denne analysen som er beregnet for våre instrumenter. Dette antistoffet er mye dyrere enn det vi bruker, og det er ikke samme klon. Patologene hos oss foretrekker den klonen som brukes hos enheten. FISH er dyrere og mer tidkrevende enn IHC, og derfor blir det gjort IHC på alle adenokarsinomer i lunge. De som er positive på IHC blir det gjort FISH på.”

- Bruk av antistoff beregnet til forskning kan kun begrunnes under IVDR dersom det ikke finnes alternativ tilgjengelig på markedet som kan dekke behovet eller at behovet ikke dekkes like godt. Siden enheten bruker antistoffet til diagnostikk og det finnes noe annet på markedet, vil bruk av antistoffet ikke kunne begrunnes under IVDR. Det anbefales å teste ut RTU antistoff som er beregnet til diagnostisk bruk sammen med instrumentet.
- Dersom patologene foretrekker denne klonen anbefales det at enheten lager dokumentasjon som begrunner valg av denne klonen over andre.

4.4. Valideringsrapporter

Valideringsrapportene er dokumenter som utarbeides fra valideringsplaner som benyttes når et nytt antistoff skal utprøves og innføres som en del av rutineanalyser hos enheten. Disse er EQS dokumenter som utarbeides for alle IHC-analyser av spesialbioingeniører eller fagansvarlige bioingeniører, og som oppdateres når det gjøres endringer på analysene. Dokumentene er bygd opp som tabeller der det er sjekkpunkt for hva som skal svares på i rapporten, og er i utgangspunktet godt egnet til å oppfylle dokumentasjonskravet til IVDR artikkel 5, punkt 5.

Ved oppstart av verifisering/validering av nye analyser blir det satt opp en valideringsplan. Dette dokumentet er identisk til valideringsrapporten med unntak at parameterne som gjelder for resultatene ikke er utfylt. Når validering og utprøving av antistoff er ferdig, bør de parameterne som gjelder resultater og avvik fra produsenten fylles ut. Utfyllelsen av disse dokumenter bærer noe preg av at de kun er ment til intern bruk og at ikke alle feltene er vurdert eller dokumentert tilstrekkelig. En del felt er gjentatte ganger markert som «ikke relevant» uten

at det kommer frem hvorfor. Eksempler på dette er «begrensninger», «selektivitet» og «interferenser».

Et felt i valideringsrapporten som er særlig relevant til denne rapporten er «avvik fra leverandørs anbefaling». Her bør det stå om utprøving og protokoll som ble utarbeidet under valideringsplan avviker fra anbefalinger fra produsenten eller ikke. Dette feltet er korrekt utfyllt i noen tilfeller, men i andre tilfeller står det “ingen avvik” selv om det finnes avvik fra anbefalinger. Begrunnelse fra veiledere er det glemmes å fylle ut dette feltet igjen ved ferdig testing av antistoffene, og dermed ikke nødvendigvis gjenspeiler det som brukes i selv utprøving.

Noen av feltene ser ut til å være fylt ut på en standardisert måte da informasjonen er lik i alle rapportene; dette gjelder for “avvik fra leverandør” hvor praksisen er å sette in “ingen avvik” ved utfylling av valideringsplan. En slik utfylling kan føre til feil dersom det brukes klipp og lim. Det kan også være ugunstig å ha for mye standardisert informasjon i individuelle rapporter fordi det kan føre til at feltene fylles ut som en del av rutine, uten at det den mest relevante informasjonen leses nøye.

Det anbefales at enheten gjør en vurdering av malene til disse dokumentene. Dokumentene kan utvides slik at de inkluderer begrunnelse til avvik fra produsentens anbefalinger, og vurdering av resultater dersom protokoll som ble valgt anses å ha bedre kvalitet enn det som er anbefalt av produsenten. Samtidig kan disse dokumentene inkludere en begrunnelse fra patologen på hvorfor en klon er foretrukket over en annen.

Denne rapporten foreslår i tillegg å fjerne informasjon som er standardisert eller legge dette til valideringsrapporten som referanser. Feltene bør fylles ut med riktig informasjon som oppdateres etter utprøving er ferdig. Alle valideringsplaner bør teste ut metoder med antistoff som er beregnet til bruk sammen med BenchMark Ultra der produsentens anbefalinger følges. Disse testene kan da brukes som dokumentasjonsgrunnlag for å begrunne avvik dersom resultatene ikke er tilfredsstillende. Videre anbefales det at enheten forklarer de feltene merkes som “ikke relevant” til hver valideringsplan eller -rapport.

4.5. Kontrollmaterial

Ved Enhet for immunhistokjemi har veileder jobbet parallelt med tolking og innføring av IVDR mens denne rapporten ble skrevet. På grunn av dette, ble det underveis i arbeidet oppdaget at kontrollmaterialet som benyttes til immunanalyser hos enheten også påvirkes av regulativet. Det brukes forskjellige multivevsblokker (MTb) hos enheten som inneholder en blanding av ulike typer vev i samme blokk. Bioingeniører og patologer bestemmer hvilken MTb er best egnet til hver enkelt analyse, og blokken benyttes til å lage kontrollpreparater som farges sammen med prøvematerialet. I noen tilfeller inneholder ikke MT-blokken det samme type vev som er anbefalt av produsenten. Et slik eksempel er CD163 protein/antigen analyse, hvor anbefalt positiv kontrollmateriale skal inneholde placenta, mens enheten bruker MTb-1 kontroll som inneholder appendiks, lever, pankreas og tonsill.

På grunn av tidsbegrensninger, diskuteres ikke prosedyrer og begrunnelse for dagens praksis i detalj. Det gjøres istedenfor en enkel vurdering av bruken av kontrollmateriale ved innføring av IVDR. Bruk og produksjon av kontrollmaterial vil også dekkes av artikkel 5, punkt 5 og dermed gjelder også de samme kravene her som for bruk av antistoff.

Valideringsrapportene inneholder informasjon om type blokk benyttet til analyse og type vev som blokk inneholder, men det spesifiseres ikke hvilket vev som benyttes som positiv eller negativ kontroll. Det anbefales å spesifisere dette i valideringsrapportene.

IVDR spesifiserer at helseinstitusjoner kan lage reagenser internt som benyttes til analyser, disse reagensene betegnes som "in house reagenser". Dette betyr at enheten bør kunne fortsette å lage og benytte multivevsblokkene som kontrollmaterial gitt at de kan dokumentere at dette ikke kan kjøpes kommersielt eller at det er bedre egnet enn kommersielle kontrollmaterial. Samtidig anbefales det at enheten følger anbefalinger fra produsent når de spesifiserer hvilke typer kontrollmateriale som er best egnet til å bruke sammen med en analyse. Et annet alternativ er å produsere dokumentasjon som viser at bruk av vevet i internt laget kontroll er bedre egnet enn det som er anbefalt av produsenten. Enheten kan fortsatt benytte vevsrester til å lage MTb kontroll, men anbefalt type vev fra produsenten bør benyttes.

5. KONKLUSJON

IVDR er et regulativ som erstatter et direktiv. Selv om målsetningene er like, fører dette til strengere føringer med prosessene. Hovedvekten av kravene som fremsettes i IVDR er rettet mot produsenter som må gjennom en sertifiseringsprosess for å få produktene sine CE-merket slik at de kan selges og brukes i hele EU. Dette gir større forutsigbarhet for produsenter. Det sikrer også høy kvalitet på produkter, noe som er viktig for medisinske produkter med tanke på pasientsikkerhet.

IVDR har innvirkning på helseinstitusjoner og hvordan laboratorier innenfor disse arbeider. Det er vanlig at det produseres og modifiseres på in vitro medisinske produkter i medisinske laboratorier, og IVDR åpner opp for at denne praksisen skal kunne fortsette ved å gi unntak til regulativet. For at helseinstitusjoner skal få unntak til IVDR er det krav som må oppfylles, dette gjelder i stor grad dokumentasjon. Men IVDR stiller også krav til at det kan bevises at avviket som praktiseres kan rettferdiggjøres med at det ikke finnes noen bedre løsning som kan brukes.

For Enhet for immunhistokjemi ved St. Olavs hospital betyr dette at rutinene må endres med tanke på bruk av antistoff i sine analyser. Systematisk dokumentasjon av avgjørelsesprosesser er en viktig del. I noen tilfeller vil de måtte gjøre flere utprøvelser for å bevise at de har beste praksis, mens i andre tilfeller må de kanskje gjøre endringer.

I arbeidet med denne rapporten har det ikke kommet frem noe som tyder på at kvaliteten som leveres av enheten ikke er utmerket. Men informasjonen som er gitt til dette prosjektet tyder på at det er nødvendig med en gjennomgang av rutiner når det gjelder dokumentering og valg av antistoff som skal testes. Enheten bruker instrumentet BenchMark Ultra fra Roche i alle analysene som er undersøkt i denne rapporten, og det er ikke lagt frem at det finnes et alternativ til denne bruken i dag. Det bør undersøkes videre om denne begrensningen kan rettferdiggjøres eller om de må innføre andre instrumenter i de tilfellene det er ønske om å bruke antistoff fra andre produsenter. Det må også sikres at informasjon fra produsentene er oppdatert før endringer gjøres.

IVDR vil også ha innvirkning på bruk av andre in vitro medisinske produkter enn antistoff. Dette gjelder for eksempel kontrollmateriale som lages på enheten. Også her vil det være nødvendig med gjennomgang av dokumentasjon.

6. REFERANSER

Anonymous. (2016, juni 16). *Regulations, Directives and other acts* [Text]. European Union. https://europa.eu/european-union/eu-law/legal-acts_en

Anti-Histone H3.3 G34W Rabbit Monoclonal Antibody, Clone RM263; Histone H3.3 G34W Mutant / RevMAb. (u.å.). Hentet 27. mars 2020, fra <https://www.revmaab.com/index.php/product/anti-histone-h3-3-g34w-rabbit-monoclonal-antibody-clone-rm263-histone-h3-3-g34w-mutant/>

Avdeling for patologi—St. Olavs hospital. (u.å.). Hentet 30. mars 2020, fra <https://stolav.no/fag-og-forskning/lab/avdeling-for-patologi->

BenchMark ULTRA system. (u.å.). Hentet 16. april 2020, fra <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/systems/benchmark-ultra-system.html>

CE-merking | standard.no. (u.å.). Hentet 23. april 2020, fra <https://www.standard.no/standardisering/ce-merking/>

Cell Conditioning 1 (CC1). (u.å.). Hentet 24. april 2020, fra <http://reagent-catalog.roche.com/product/203?type=204>

Chapter 05: Qualitative Research Methods - ProQuest. (u.å.). Hentet 6. april 2020, fra <https://search.proquest.com/docview/1812274415?OpenUrlRefId=info:xri/sid:primo&accountid=12870>

CST - ROS1 (D4D6®) Rabbit mAb. (u.å.). Hentet 27. mars 2020, fra www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/ros1-d4d6-rabbit-mab/3287

Davies, J. A. (2004). Welcome to Organogenesis! *Organogenesis*, 1(1), 1–2.

de Leer, W. B., & Lequin, R. M. (2000). The European In-Vitro Diagnostic Medical Devices Directive: Its Implications on the Clinical Marketplace and Healthcare Measurement Standards. *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation*, 5(2), 66–68. <https://doi.org/10.1016/S1535-5535-04-00063-2>

EUR-Lex—31998L0079—EN - EUR-Lex. (u.å.). Hentet 25. mars 2020, fra <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A31998L0079>

Galdas, P. (2017). Revisiting Bias in Qualitative Research: Reflections on Its Relationship With Funding and Impact. *International Journal of Qualitative Methods*, 16(1), 1609406917748992. <https://doi.org/10.1177/1609406917748992>

Grenness, T. (1997). Innføring i vitenskapsteori og metode. I *Barnebokinstituttet*. Tano Aschehoug. https://urn.nb.no/URN:NBN:no-nb_digibok_2008071400110

In vitro-diagnostisk medisinsk utstyr—Regjeringen.no. (u.å.). Hentet 30. mars 2020, fra <https://www.regjeringen.no/no/sub/eos-notatbasen/notatene/2015/mars/in-vitro-diagnostisk-medisinsk-utstyr/id2502171/>

ISO - International Organization for Standardization. (u.å.). ISO. Hentet 24. april 2020, fra <https://www.iso.org/home.html>

Lov om spesialisthelsetjenesten m.m. (Spesialisthelsetjenesteloven)—Kapittel 1. Formål og virkeområde—Lovdata. (u.å.). Hentet 1. april 2020, fra https://lovdata.no/dokument/NL/lov/1999-07-02-61/KAPITTEL_1#KAPITTEL_1

Nastic, D., & Wagner, J. (2013). *Histologi- en oversikt* (1. utg.). Pozkal, Poland.

NordiQC - Immunohistochemical Quality Control. (u.å.). Hentet 27. mars 2020, fra <https://www.nordiqc.org/epitope.php?id=38>

O'Brien, P., Morin, P., Ouellette, R. J., & Robichaud, G. A. (2011). The Pax-5 Gene: A Pluripotent Regulator of B-cell Differentiation and Cancer Disease. *Cancer Research*, 71(24), 7345–7350. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1874>

OptiView Amplification Kit. (u.å.). Hentet 24. april 2020, fra <http://reagent-catalog.roche.com/product/1575?type=2038>

Organisasjon og oppgaver—Legemiddelverket. (u.å.). Statens legemiddelverk. Hentet 1. april 2020, fra <https://legemiddelverket.no/om-oss/organisasjon>

regjeringen.no. (2015, oktober 16). *Hva EØS-avtalen omfatter* [Redaksjonellartikkel]. Regjeringen.no; regjeringen.no. <https://www.regjeringen.no/no/tema/europapolitikk/eos1/hva-avtalen-omfatter/id685024/>

regjeringen.no. (2018, januar 24). *Norges samarbeid med EU* [Redaksjonellartikkel].
Regjeringen.no; regjeringen.no. <https://www.regjeringen.no/no/tema/europapolitikk/tema-norge-eu/norge-eu/id684934/>

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 (Text with EEA relevance.), Pub. L. No. 32017R0746, 117 OJ L (2017).
<http://data.europa.eu/eli/reg/2017/746/oj/eng>

Schaefer, I.-M., Fletcher, J. A., Petur Nielsen, G., Shih, A. R., Ferrone, M. L., Hornick, J. L., & Qian, X. (2018). Immunohistochemistry for Histone H3G34W and H3K36M Is Highly Specific for Giant Cell Tumor of Bone and Chondroblastoma, Respectively, in FNA and Core Needle Biopsy. *Cancer cytopathology*, 126(8), 552–566. <https://doi.org/10.1002/cncy.22000>

Senter for faglig kommunikasjon (SEKOM)—IMRoD - NTNU. (u.å.). Hentet 24. april 2020, fra <https://www.ntnu.no/sekom/hva-er-imrod>

Tailor, C. R., & Rudbeck, L. (2013). *IHC Guidebook- Immunohistochemical staining methods 6th Edition*. Dako, Danmark.
file:///C:/Users/Bruker/Desktop/Histologi/08002_ihc_staining_methods.pdf

Takeuchi, K., Soda, M., Togashi, Y., Suzuki, R., Sakata, S., Hatano, S., Asaka, R., Hamanaka, W., Ninomiya, H., Uehara, H., Lim Choi, Y., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Mano, H., & Ishikawa, Y. (2012). RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nature Medicine; New York*, 18(3), 378–381. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2658>

UltraView Universal DAB Detection Kit. (u.å.). Hentet 23. april 2020, fra <http://reagent-catalog.roche.com/product/1414?type=1791>

7. Vedlegg A

IVDR – Annex I

Annex I tas med i rapporten fordi unntakene satt frem i artikkel 5 kun gjelder om alle kravene satt frem i annex I anses som oppfylt. Disse generelle sikkerhetskravene gjelder både produsenter av IVMU og helseinstitusjoner som skal ta IVMU i bruk. Oversettelse og tolking benyttes ikke fordi det er ikke tolking av innhold som er viktig her, men at disse generelle kravene oppfylles før IVMU tas i bruk.

GENERAL SAFETY AND PERFORMANCE REQUIREMENTS

GENERAL REQUIREMENTS

1. Devices shall achieve the performance intended by their manufacturer and shall be designed and manufactured in such a way that, during normal conditions of use, they are suitable for their intended purpose. They shall be safe and effective and shall not compromise the clinical condition or the safety of patients, or the safety and health of users or, where applicable, other persons, provided that any risks which may be associated with their use constitute acceptable risks when weighed against the benefits to the patient and are compatible with a high level of protection of health and safety, taking into account the generally acknowledged state of the art.
2. The requirement in this Annex to reduce risks as far as possible means the reduction of risks as far as possible without adversely affecting the benefit-risk ratio.
3. Manufacturers shall establish, implement, document and maintain a risk management system.

Risk management shall be understood as a continuous iterative process throughout the entire lifecycle of a device, requiring regular systematic updating. In carrying out risk management manufacturers shall:

- (a) establish and document a risk management plan for each device;
- (b) identify and analyse the known and foreseeable hazards associated with each device;

(c) estimate and evaluate the risks associated with, and occurring during, the intended use and during reasonably foreseeable misuse;

(d) eliminate or control the risks referred to in point (c) in accordance with the requirements of Section 4;

(e) evaluate the impact of information from the production phase and, in particular, from the post-market surveillance system, on hazards and the frequency of occurrence thereof, on estimates of their associated risks, as well as on the overall risk, the benefit-risk ratio and risk acceptability; and

(f) based on the evaluation of the impact of the information referred to in point (e), if necessary amend control measures in line with the requirements of Section 4.

4. Risk control measures adopted by manufacturers for the design and manufacture of the devices shall conform to safety principles, taking account of the generally acknowledged state of the art. To reduce risks, the manufacturers shall manage risks so that the residual risk associated with each hazard as well as the overall residual risk is judged acceptable. In selecting the most appropriate solutions, manufacturers shall, in the following order of priority:

(a) eliminate or reduce risks as far as possible through safe design and manufacture;

(b) where appropriate, take adequate protection measures, including alarms if necessary, in relation to risks that cannot be eliminated; and

(c) provide information for safety (warnings/precautions/contra-indications) and, where appropriate, training to users.

Manufacturers shall inform users of any residual risks.

5. In eliminating or reducing risks related to use error, the manufacturer shall:

(a) reduce as far as possible the risks related to the ergonomic features of the device and the environment in which the device is intended to be used (design for patient safety), and

(b) give consideration to the technical knowledge, experience, education, training and use environment, where applicable, and the medical and physical conditions of intended users (design for lay, professional, disabled or other users).

6. The characteristics and performance of a device shall not be adversely affected to such a degree that the health or safety of the patient or the user and, where applicable, of other persons are compromised during the lifetime of the device, as indicated by the manufacturer, when the device is subjected to the stresses which can occur during normal conditions of use and has been properly maintained in accordance with the manufacturer's instructions.

7. Devices shall be designed, manufactured and packaged in such a way that their characteristics and performance during their intended use are not adversely affected during transport and storage, for example, through fluctuations of temperature and humidity, taking account of the instructions and information provided by the manufacturer.

8. All known and foreseeable risks, and any undesirable effects shall be minimised and be acceptable when weighed against the evaluated potential benefits to the patients and/or the user arising from the intended performance of the device during normal conditions of use.

8. Vedlegg B

Valideringsrapport - CD163

Forfatter: Lise Eid Wålberg
Godkjent av: Gudrun Hovstein Erikstad

Gyldig fra: 31.01.2020
Revisjonsfrist: 29.07.2020

Revisjon: 1.1
ID: 41326

1 Bakgrunn	
1.1 Analysemetode	
Analysemetodens/instrumentets navn	CD163
Valideringstidspunkt/periode	Oktober 2019 – januar 2020
Oppdragsgiver	Avdeling for patologi
Årsak til valideringen	CD163 er i dag i rutinebruk i mange (de fleste) laboratorier, og det er ønskelig å implementere denne analysen som et supplement til CD68 som allerede finnes i rutinediagnostikken ved avdelingen. Instrumenter og reagenser har egen valideringsdokumentasjon, se Validering BenchMark Ultra .
Avdelingens kontaktperson	Hilde Fløystad, Fagansvarlig bioingeniør Lise Eid Wålberg, Spesialbioingeniør
Bruksområde	Dette er en markør som brukes til å detektere monocytter/makrofager, og er et nyttig supplement i hematopatologi/lymfom ved diagnostikk av histiocytære tumorer (makrofag/monocytumorer), men også i bløtvevspatologi og generelt. Denne markøren er mer sensitiv enn CD68, noe som kan være en fordel.
Klinisk validering, klinisk nytte	Ikke relevant
Antistoff/probe/okus/gen/markør	CD163, klon MRQ-26 CD163, klon 10D6
Produsent/leverandør	CellMarque/AH Diagnostics Leica, Novocastra/Ortomedic
Referansemetode/referanse Antistoff/probe/okus/gen/markør	CD68 som allerede benyttes i rutinediagnostikken er også en markør som farger monocytter/makrofager
Analyseprinsipp	Se prosedyre Immunhistokjemi - Daglig bruk av Benchmark Ultra
Dokumenter	<ul style="list-style-type: none">Immunhistokjemi - Valg av primærantistoff til utprøvingImmunhistokjemi - Utprøving og validering av primærantistoffImmunhistokjemi - Implementering av primærantistoff i rutinediagnostikkVedlegg «CD163, CellMarque» under relatertVedlegg «CD163, NCL» under relatertVedlegg «Skjema - Ønske om nytt primærantistoff CD163» under relatert



Referanser	<ul style="list-style-type: none"> • Pakningsvedlegg: Cell Marque. CD163 (MRQ-26) Mouse Monoclonal Antibody, Ref. 163M-15. EN Rev. 4.0. Rocklin, California: Cell Marque; CMC16321040 • Pakningsvedlegg: Leica Biosystems. Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD163, Product Code: NCL-L-CD163. Rev D. Newcastle: Leica Biosystems; CD163-L-CE 07/11/2018 • NordiQC. CD163 [Internett]. Publisert 06.04.2011 [Sisert 31.10.2019]. Tilgjengelig fra: https://nordiqc.org/epitope.php?id=38
2 Vurdering av ytelse	
Metodens egnethet	Se pakningsvedlegg for antistoff og deteksjonskit: <ul style="list-style-type: none"> • Pakningsvedlegg antistoff CD163, klon MRQ-26: Cell Marque. CD163 (MRQ-26) Mouse Monoclonal Antibody, Ref. 163M-15. EN Rev. 4.0. Rocklin, California: Cell Marque; CMC16321040 • Pakningsvedlegg antistoff CD163, klon 10D6: Leica Biosystems. Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD163, Product Code: NCL-L-CD163. Rev D. Newcastle: Leica Biosystems; CD163-L-CE 07/11/2018 • Pakningsvedlegg deteksjonskit: Ventana. OptiView DAB IHC Detection Kit, Ref. 760-700. Rev. A. Tucson, Arisona: Ventana Medical Systems; 2011-06-23
Begrensninger	Ikke relevant
Selektivitet	Ikke relevant
Interferenser	Ikke relevant
Kontaminasjon, kryssreaktivitet	Alle snittene farges individuelt slik at det er minimale muligheter for kontaminasjon og alle reagensene, med unntak av antistoff, kommer i lukkede beholdere. Kryssreaktivitet: Ikke relevant
Måleusikkerhet/Usikkerhetsbidrag	Ingen kjente
3 Validerings-/verifiseringsdetaljer	
Analysetype	Kvalitativ: Det sanne kvantitative signalet (brun eller rød farge) kan ha et av mange mulige verdier, men det endelige resultatet kan bare ha ett av to verdier (positiv eller negativ).
Parametre, analysetype/instrumenter * TP=True positive TN= True negative FN= False negative Hvor «True» betyr samsvar med referansem metode	<ul style="list-style-type: none"> • Nøyaktighet ved beregning av <ul style="list-style-type: none"> o $Sensitivitet = TP / (TP + FN) *$ o $Spesifisitet = TN / (TN + FP) *$ o Eventuelt total nøyaktighet = $((TP + TN) / (TP + TN + FP + FN))$

Parametre, robusthet			
Parameter	Aktuell	Ikke aktuell	Kommentar
Utstyr (Ulike instrumenter, pipetter, glass)		X	Robusthet vil bli verifisert fortløpende med kontroll på hvert snitt.
Reagenser (produsent, leverandør, lot, forsendelse)		X	Det vil bli valgt en produsent og leverandør. Det forventes likt resultat fra lot til lot, og at forsendelsen blir behandlet på riktig måte. Robusthet vil bli verifisert fortløpende med kontroll på hvert snitt.
Operatør (erfaren, uerfaren)		X	Alle får opplæring. Robusthet vil bli verifisert fortløpende med kontroller på hvert snitt
Prøvemateriale (type vev, fikseringsmiddel, fikseringstid, type blod, alder)		X	Formalinfiksert, parafinnstøpt vev (evt cytologi), resten er ikke relevant.
Lokalisasjon (Laboratorier, rom, bygninger)		X	Kun en lokalisasjon.
Miljø (temperatur, luftfuktighet, lysforhold)		X	Stabile miljøforhold.

Andre parametre	Parameter	Aktuell	Ikke aktuell	Kommentar
	Praktisk gjennomførbarhet på laboratoriet		X	<p>Dette er vurdert ved validering av instrument og reagenser, se Validering BenchMark Ultra.</p>
	Brukervennlighet		X	Bruker konsentrat
	HMS		X	<p>Dette er vurdert ved validering av instrument og reagenser, se Validering BenchMark Ultra.</p>
	Konsekvenser for ytre miljø		X	<p>Dette er vurdert ved validering av instrument og reagenser, se Validering BenchMark Ultra.</p>
Prøvemateriale	<p>Formalinfiksert, parafininnstøpt materiale. Vevstyper antistoffet er testet ut på: Tonsille, beinmarg, granulærcelletumor, kronisk myelomonocyt leukemi (KMML), akutt myelogen leukemi (AML) med monocyttdifferensiering, Rosai Dorfman sykdom, og Mb1-kontrollen som inneholder appendiks, lever, pankreas og tonsille. Antistoffet er kun testet ut på noen typer vev, men kan sannsynligvis brukes på andre vev enn det som er testet ut.</p>			
Avvik fra leverandørs anbefalinger	Ingen			
Validering eller verifisering	<p>Verifisering Antistoffet er validert for in vitro diagnostikk og CE-merket av leverandøren. Verifisering gjøres før implementering.</p>			
Akkreditering	Aktuelt			
Risikovurdering av valideringsprosessen	Ikke aktuelt			
4 Validering/verifisering, delplaner og delresultater				
4.1 Kartlegging av økonomi				

<p>Beregning av kostnad før validering</p>	<p>På grunn av at man ikke vet fortynningen før utprøving av antistoff, er det tatt utgangspunkt i fortynningene som er anbefalt av produsent for beregning av kostnad.</p> <p>CD163, klon MRQ-26: Forventet kostnad per analyse ved fortynning 1:10:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pris per snitt reagens: <u>49,19 kroner</u> • Pris per snitt antistoff: $3463/((500*10)/100) =$ <u>69,26 kroner</u> • Pris per snitt totalt: $49,19 + 69,26 =$ <u>118,45 kroner</u> <p>Forventet kostnad per analyse ved fortynning 1:50:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pris per snitt reagens: <u>49,19 kroner</u> • Pris per snitt antistoff: $3463/((500*50)/100) =$ <u>13,85 kroner</u> • Pris per snitt totalt: $49,19 + 13,85 =$ <u>63,04 kroner</u> <p>CD163, klon 10D6: Forventet kostnad per analyse ved fortynning 1:200:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pris per snitt reagens: <u>49,19 kroner</u> • Pris per snitt antistoff: $4014/((1000*200)/100) =$ <u>2,01 kroner</u> • Pris per snitt totalt: $49,19 + 2,01 =$ <u>51,20 kroner</u> <p>Forventet antall analyser per år: over 100</p> <p>Ved sammenligning av to eller flere antistoff, vil pris være med å spille en rolle i helhetsvurderingen av antistoffene.</p>
<p>Beregning av kostnad etter validering</p>	<p>Som beregnet for CD163, klon 10D6, fortynning 1:200.</p>
<p>4.2 Optimalisering av metoden</p>	
<p>Faktorer som optimaliseres</p>	<p>Faktorer som skal optimaliseres:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Konsentrasjon: Utføres ved titreringsrekke • Forbehandling og tid med utgangspunkt i produsenten og NordiQC sine anbefalinger. • Inkubasjonstid antistoff med utgangspunkt i produsenten og NordiQC sine anbefalinger. • Evt. amplifisering <p>Utgangspunkt for utprøvingen CD163, klon MRQ-26:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Forbehandling: CC1 • Forbehandlingstid: 32 og 64 min • Fortynning: 1:10, 1:50, 1:100 og 1:500 • Inkubasjonstid antistoff: 32 min • Deteksjonskit: OptiView • Amplifikasjon: Nei <p>Utgangspunkt for utprøvingen CD163, klon 10D6:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Forbehandling: CC1 • Forbehandlingstid: 32 og 64 min • Fortynning: 1:50, 1:100, 1:200 og 1:500 • Inkubasjonstid antistoff: 32 min • Deteksjonskit: OptiView • Amplifikasjon: Nei <p>Se vedlegg «CD163, CellMarque» og «CD163, NCL» under relatert.</p>

Resultat av optimalisering	Se vedlegg «CD163, CellMarque» og «CD163, NCL» under relatert.
4.3 Delplaner/delresultater valideringsparametre	
4.3.1 Arbeidsplan parameter:	Nøyaktighet
Krav til ytelse	100 % nøyaktighet
Analyseoppsett	Nøyaktigheten til protokollen bestemmes ved utprøving på flere prøver og ulike typer vev. Etter en tids bruk gjøres en ny vurdering av nøyaktigheten til protokollen.
Prøver	Formalinfiksert, parafininnstøpt materiale. Vevstyper antistoffet er testet ut på: Tonsille, beinmarg, granulærcelletumor, kronisk myelomonocyt leukemi (KMML), akutt myelogen leukemi (AML) med monocyttdifferensiering, Rosai Dorfman sykdom, og Mb1-kontrollen som inneholder appendiks, lever, pankreas og tonsille. Antistoffet er kun testet ut på noen typer vev, men kan sannsynligvis brukes på andre vev enn det som er testet ut. For informasjon om prøver som er testet ut, se vedlegg «CD163, Cell Marque» og «CD163, NL» under relatert.
Delresultat for parameter:	Nøyaktighet ved beregning av: <ul style="list-style-type: none"> • Sensitivitet: For lite tallmateriale til å beregne sensitiviteten. • Spesifisitet: For lite tallmateriale til å beregne spesifisiteten. • Total nøyaktighet: For lite tallmateriale til å beregne total nøyaktighet, men prøvene inkludert i utprøvingen ble farget som forventet, noe som gir 100 % nøyaktighet.
4.3.2 Arbeidsplan parameter:	Robusthet
Krav til ytelse	Markøren bør kunne brukes på flere typer vev.
Analyseoppsett	Robustheten til systemet og operatør blir kontinuerlig verifisert ved bruk av kontroller på alle snitt. Antistoffets robusthet testes ut vev analysing av flere vevstyper og bruk av kontroller i de tilfellene der man har kontrollmateriale som kan benyttes.
Prøver	Prøvematerialet: Formalinfiksert, parafininnstøpt materiale. For informasjon om prøver som er testet ut, se vedlegg «CD163, CellMarque» og «CD163, NCL» under relatert.
Delresultat for parameter	Se vedlegg «CD163, CellMarque» og «CD163, NCL» under relatert.
4.4 Godkjenning av validerings-/verifiseringsplan	
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS.	
Utprøver	Lise Eid Wålberg
Faglig/økonomisk ansvarlig	Maria Luisa Holten
Medisinsk ansvarlig	Håkon Hov
Valideringsansvarlig	Gudrun Hovstein Erikstad
5 Validerings-/verifiseringsresultater	

Tolkning og resultat	<p>Se vedlegg under relatert:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vedlegg «CD163, CellMarque» • Vedlegg «CD163, NCL» • «Protokoll navn antistoff» <p>Oppsummering av resultatene for CD163, klon 10D6:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Forbehandling: CC1 • Tid forbehandling: 32 min • Fortynning: 1:200 • Inkubasjonstid antistoff: 32 min • Deteksjonskit: OptiView • Amplifisering: Nei <p>Protokollene for klon MRQ-26 og 10D6 gir ganske likt fargerresultat. Men protokollen til klon 10D6 fra Leica Novocastra trenger kortere forbehandling, og på grunn av dette ser man at bakgrunns morfologien i beinmarg blir bedre. Velger derfor å implementere klon 10D6 i rutinediagnostikken.</p> <p>Resultatene tilfredsstiller validerings-/verifiseringskravene (krav til ytelse i 4.3) for klon 10D6 fra Leica Novocastra. Prøvematerialet er foreløpig for lite. En ny vurdering vil bli gjort etter 6mnd bruk.</p>
Arkivering av resultater	Arkiveres i EQS med vedlegg under relatert.
6 Kontinuerlig kvalitetskontroll	
Intern kvalitetskontroll	Kontroll: Mb1-kontrollen, som inneholder appendiks, lever, pankreas og tonsille. Kontroll brukes på alle snitt.
Ekstern kvalitetskontroll	Enhet for immunhistokjemi deltar i to eksterne kvalitetssikringsprogram, NordiQC og Neqas. Det er de to eksterne programmene som bestemmer hvilke antistoff som skal testes, og derfor vil man ikke ha resultater for alle antistoffene som brukes i rutinediagnostikken.
7 Implementering	
Prosedyrer som oppdateres	 Immunhistokjemi - Analyseoversikt
Prosedyrer som opprettes	Ikke relevant
Nødvendig opplæring	Autorisasjon dokumentert i kompetanseplaner
Informasjon (intern/ekstern)	Det sendes ut internmelding i Sympathy til alle leger når antistoffet tas i bruk på BenchMark Ultra.
Endringer i rekvisisjonsskjema	Ingen endring
Laboratoriedatasystem	Ny analysekode: CD163-S
Risikovurdering	 Risikovurdering - Immunfargesystem, PASU
Dato planlagt innført i rutinen	Januar 2020
8 Konklusjon	
Totalvurdering av validering/verifisering	Akseptert for klon 10D6 fra Leica Novocastra. Ikke akseptert for klon MRQ-26 fra Cell Marque.
8.1 Godkjenning av valideringsprotokoll	
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS.	
Utprøver	Lise Eid Wålberg
Faglig ansvarlig	Maria Luisa Holten
Medisinsk ansvarlig	Håkon Hov

Relaterte dokumenter

-  Immunhistokjemi - Analyseoversikt
-  Immunhistokjemi - Daglig bruk av Benchmark Ultra
-  Immunhistokjemi - Implementering av primærantistoff i rutinediagnostikk
-  Immunhistokjemi - Utpøving og validering av primærantistoff
-  Immunhistokjemi - Valg av primærantistoff til utpøving
-  Risikovurdering - Immunfargesystem, PASU
-  Validering BenchMark Ultra

Vedlegg

-  CD163, CellMarque
-  CD163, NCL
-  Protokoll CD163
-  Skjema - Ønske om nytt primærantistoff CD163

