

# VALIDATIE VAN TESTEN

Een uitdaging in elk domein - Pathologie

Hannelien Verbeke ([hannelien.verbeke@sciensano.be](mailto:hannelien.verbeke@sciensano.be))

Dienst Kwaliteit van laboratoria

02 maart 2021

# Inleiding

## FEDERALE OVERHEIDSDIENST VOLKSGEZONDHEID, VEILIGHEID VAN DE VOEDSELKETEN EN LEEFMILIEU

§ 5. De vereisten van het kwaliteitssysteem worden toegelicht in een praktijkrichtlijn uitgewerkt door de Commissie voor pathologische anatomie zoals bedoeld in artikel 42.

# Inleiding

## **Praktijkrichtlijn voor het opzetten van een kwaliteitssysteem in de erkende laboratoria voor pathologische anatomie werkzaam binnen het kader van het Erkenningsbesluit**

Versie 1 – 31/01/2014

[https://www.wiv-isp.be/QML/activities/licence/\\_nl/licence-anapath.htm](https://www.wiv-isp.be/QML/activities/licence/_nl/licence-anapath.htm)



In revisie

# Inleiding

## In revisie

- Verdere toelichtingen en verduidelijkingen
- Hoofdstuk 5.5: Validatie van analytische testen
  - Werkwijze
  - Wetgeving

**VERORDENING (EU) 2017/746 VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD**

**van 5 april 2017**

**betreffende medische hulpmiddelen voor in-vitrodiagnostiek en tot intrekking van Richtlijn 98/79/EG en Besluit 2010/227/EU van de Commissie**

# Inleiding

## VERORDENING (EU) 2017/746 VAN HET EUROPEES PARLEMENT EN DE RAAD

van 5 april 2017

betreffende medische hulpmiddelen voor in-vitrodiagnostiek en tot intrekking van Richtlijn 98/79/EG en Besluit 2010/227/EU van de Commissie

- Treedt in werking op 26 mei 2022
- Indien CE-IVD kits/reagentia niet volgens bijsluiter = LDT
- Klinische en analytische performantie

### VRAGEN:

- Wat valt onder LDT?
- Hoe valideren?

Praktijkrichtlijn

Art. 5.5. c) het laboratorium van de zorginstelling voldoet aan norm EN ISO 15189 of in voorkomend geval aan toepasselijke nationale bepalingen, waaronder nationale bepalingen wat betreft accreditatie

# Validatie versus verificatie

## ➤ Validatie

- aan de hand van objectief bewijsmateriaal wordt aangetoond dat de performantiekenmerken voldoen aan de vooraf gedefinieerde criteria of specifieke eisen voor een bepaald doel of beoogd gebruik.
- door de fabrikant
- indien LTD: door het laboratorium

## ➤ Verificatie

- aan de hand van objectief bewijsmateriaal wordt geconfirmeerd dat een test voldoet aan de specificaties (specifieke eisen).
- specifieke eisen reeds gedefinieerd en gevalideerd door de fabrikant
- door het laboratorium

# Verificatie/validatiedossier



Verificatie/validatieplan	Verificatie/validatierapport
Reden	Resultaten risicoanalyse
Beoogde doel	Gebruikte reagentia
Toestel en reagentia	Staalselectie en aantal stalen
Risicoanalyse	Datum uitvoering van elk onderzoek
De betrokken medewerkers	Identiteit uitvoerders onderzoeken, Beoordelaars resultaten
De werkwijze: <ul style="list-style-type: none"><li>- Optimalisatietesten</li><li>- Performantiekarakteristieken</li><li>- Stalen</li><li>- Verificatie/validatieonderzoeken</li><li>- Beoordeling resultaten</li></ul>	De resultaten per staal/coupe en per run
Aanvaardbaarheidscriteria	Tussentijdse conclusies
Referenties	Algemene conclusie
Implementatie	Vrijgavedatum en identiteit autorisator

# Optimalisatie

- Voldoet analytische test aan vooropgestelde criteria?
  - Standaard- of fabrieksprotocol beoordelen m.b.v. door de fabrikant/leverancier vooropgestelde criteria
  
- Werkwijze?
  - Controlemateriaal
  - 2 gekende positieve en 2 gekende negatieve controlestalen



# Verificatie/validatie

Werkwijze afhankelijk van

- De **oorsprong** (CE-IVD, off-label, niet CE-IVD)
- De **testmethode** (basiskleuring, histochemische en immunohistochemische kleuring, enz.)
- Het **beoogde doel** (diagnostisch, prognostisch, farmaco-predictief)
- De **uitvoeringswijze** (manueel, geautomatiseerd) en type toestel (open, half open, gesloten)

# Verificatie/validatie - oorsprong

CE-IVD: In Vitro Diagnostisch gebruik

LDT: Laboratory Developed Test ← IVDR

- CE-IVD off label met referentie
- CE-IVD off-label zonder referentie
- RUO (Research Use Only; niet CE-IVD) met referentie
- Niet CE-IVD zonder referentie of in eigen beheer ontwikkeld

# Verificatie/validatie – testmethode en beoogde doel

Testmethode	Subtype	Doel
<b>Basiskleuringen</b>	Hematoxyline – Eosine (Safraan) kleuring	Diagnostisch
	Papanicolaou-kleuring, MGG	Screening/Diagnostisch
<b>Histo(Cyto)chemische kleuringen</b>		Diagnostisch
<b>Immunohisto(cyto)chemische kleuringen</b>	Type 1	Diagnostisch
	Type 2a	Prognostisch
	Type 2b	Farmaco-predictief
<b>In situ hybridisatie kleuringen</b>	Type 1	Diagnostisch
	Type 2a	Prognostisch
	Type 2b	Farmaco-predictief
<b>Moleculaire technieken</b>		Screening, diagnostisch, prognostisch, of farmaco-predictief

# Verificatie/validatie - uitvoeringswijze

Type toestel	Omschrijving
<b>Open</b>	Er zijn geen beperkingen in gebruik van reagentia of testkits. <i>Voorbeeld: reagentia van andere fabrikanten/leveranciers kunnen gebruikt worden</i>
<b>Semi open</b>	Er kunnen beperkt ook andere reagentia dan deze van de toestelfabrikant gebruikt worden. <i>Voorbeeld: minstens één reagens/component (bv. detectiekit) binnen de methode moet van de toestel fabrikant afkomstig zijn. Andere reagentia (bv. antilichamen) kunnen onafhankelijk van de fabrikant/leverancier gekozen worden</i>
<b>Gesloten</b>	Er kunnen enkel specifieke reagentia en testkits gebruikt worden die specifiek voor dit toestel werden ontwikkeld. <i>Voorbeeld: sommige monolayer testen, sommige moleculaire testen</i>

# Verificatie/validatie - performantiekarakteristieken

Performantie karakteristieken	CE-IVD test	“Off label met referentie”	“Off label zonder referentie”	RUO met referentie	In eigen beheer ontwikkeld
Juistheid	x	x	x	x	x
Precisie	x	x	x	x	x
Sensitiviteit			x	x	x
Specitiviteit			x	x	x
Robuustheid	(x)	(x)	(x)	(x)	(x)
Intercollegiale toetsing	(x)	(x)	(x)	(x)	(x)

**Verificatie**

**Validatie**

# Verificatie/validatie - performantiekarakteristieken

## Nauwkeurigheid / Accuraatheid

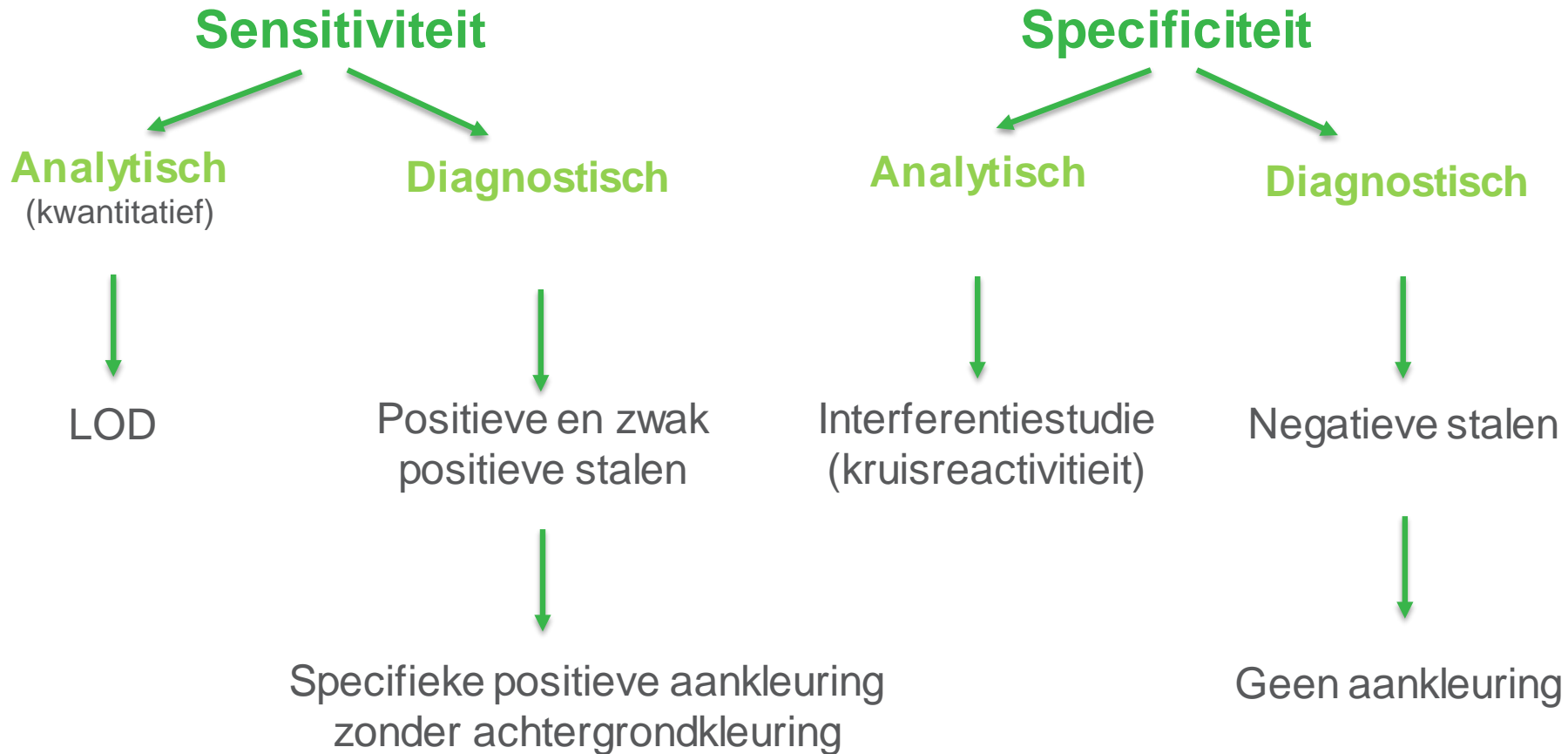
### Juistheid

- ✓ Vergelijking met gekende testresultaten van gevalideerde test
- ✓ Vergelijkingsstudie met andere gevalideerde techniek, toestel, reagentia
- ✓ Derdelijnscontrole
- ✓ Populatiestudie

### Precisie

- ✓ Herhaalbaarheidsstudie (intrarun testen)
- ✓ Intermediaire precisie (interrun testen)
- ✓ Reproduceerbaarheidsstudie (interlaboratorium reproduceerbaarheid)

# Verificatie/validatie - performantiekarakteristieken



# Verificatie/validatie - performantiekenmerken

- **Robuustheid**

- ✓ De ischemie periode vóór de fixatie
- ✓ Fixatieduur
- ✓ Soort fixatie
- ✓ Soort voorbehandeling van de stalen
- ✓ Dikte van de coupes
- ✓ Bepaling stabiliteit antigen
- ✓ Bepaling stabiliteit van reagentia
- ✓ ...

- **Intercollegiale toetsing**



# Verificatie/validatie - staalselectie

- Controlemateriaal bv. restmateriaal, archiefmateriaal, enz.
- Geverifieerde/gevalideerde stalen met gekende resultaten
- Controlemateriaal of refentiestalen afkomstig van bv. fabrikant
- EKE stalen



Hou rekening met:

- Matrix : weefsel- of celtypes (inclusief oorsprong bv. HER-2 borst vs. maag) + wijze fixatie en inbedding
- De te verwachten resultaten (bv. zwakke en sterke expressoren)

# Verificatie – CE – IVD volgens bijsluiter

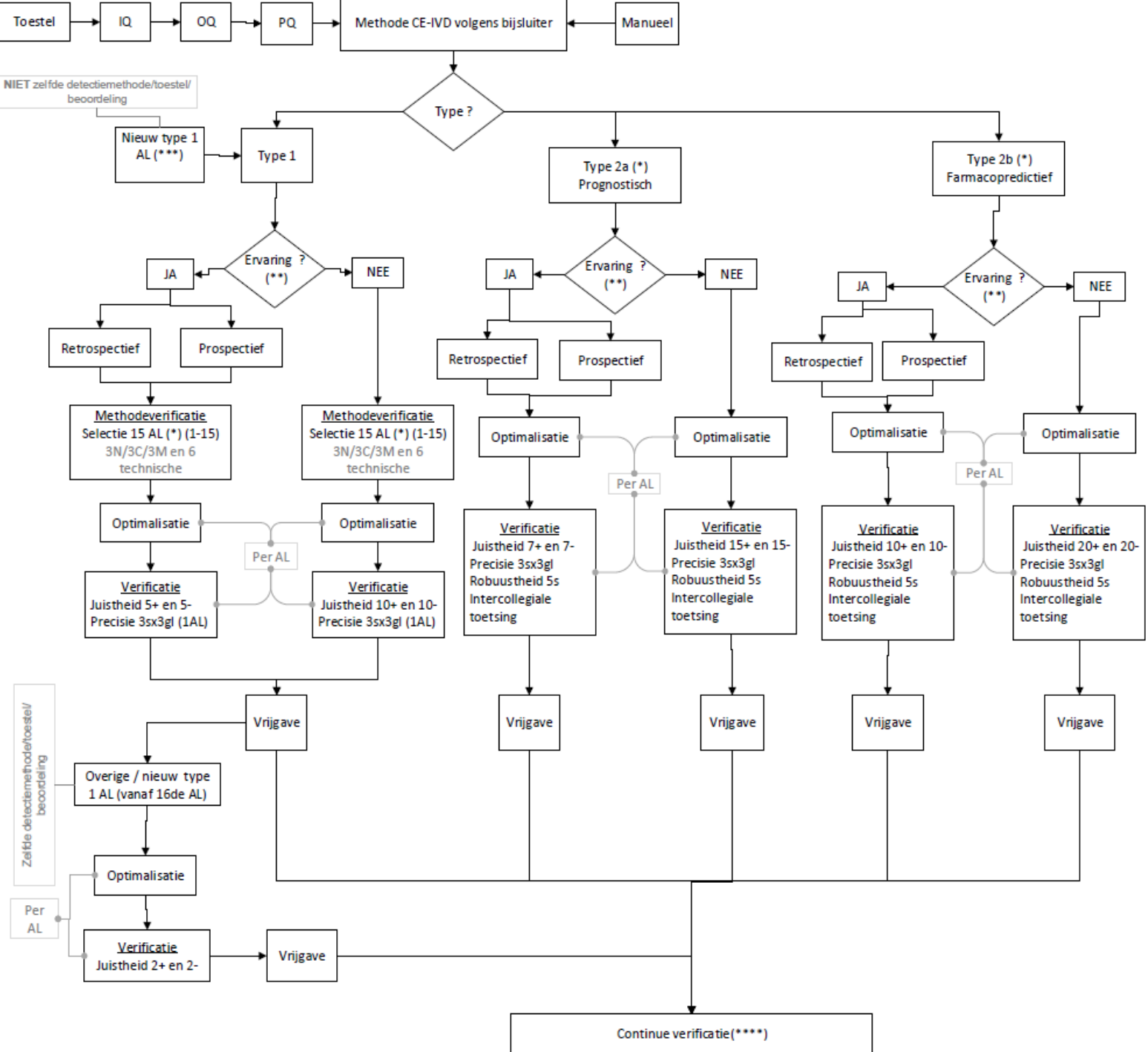
## Voorbeelden:

- CE-IVD geconcentreerd antilichaam met beperkte gegevens inzake uitvoering kleurprotocol in bijsluiter bv. elk laboratorium dient zelf de optimale verdunning te bepalen
- CE-IVD antilichaam zonder instructies m.b.t. de voorbehandeling en incubatietijden. De optimale voorbehandelingsmethode (bv. hoge of lage pH) en incubatietijd van het antilichaam bepaald door laboratorium tijdens optimalisatie. Daarna verificatie kleurprotocol (volgens de bijsluiter)
- Kleurprotocol wordt aangepast en geoptimaliseerd, maar blijft voldoen aan de specificaties zoals vermeld in de bijsluiter bv. verdunningsfactor antilichaam binnen de range zoals opgegeven door de fabrikant, keuze van één van de door de fabrikant opgegeven voorbehandelingsbuffers, enz.
- Er wordt afgeweken van de “aanbevelingen” zoals vermeld in de bijsluiter bv. aanbevolen verdunningsfactor, aanbevolen voorbehandelingsbuffer, aanbevolen toestel, aanbevolen glaasjes, enz., doch wordt voor elk van deze afwijkingen voor dezelfde fabrikant gekozen.

# Verificatie – CE – IVD volgens bijsluiter

## Voorbeelden (vervolg):

- CE-IVD antilichaam met in de bijsluiter duidelijke vermelding van de te gebruiken voorbehandeling, verdunningsfactor, detectiesysteem, enz. Daarnaast wordt vermeld dat de optimale condities variëren afhankelijk van het weefsel en de voorbehandelingsmethode en dat dit door het individuele laboratorium bepaald kan worden. Zo kan een laboratorium beslissen om bv. een versterker aan het kleurprotocol toe te voegen
- De tijd van de tegenkleuring wordt gewijzigd (geen kritisch item)
- In de bijsluiter van het antilichaam wordt de detectietechniek vermeld zonder indicatie van de te gebruiken specifieke detectiekit. Een detectiekit van een andere fabrikant wordt gebruikt (met zelfde detectiemethode als gespecificeerd in de bijsluiter van het antilichaam)
- Op een half-open toestel A wordt een IHC kleuring uitgevoerd waarbij het antilichaam afkomstig is van fabrikant B. Er zijn geen vereisten m.b.t. het gebruik van het toestel vermeld in de bijsluiter van het antilichaam van fabrikant A (hoogstens aanbevelingen)

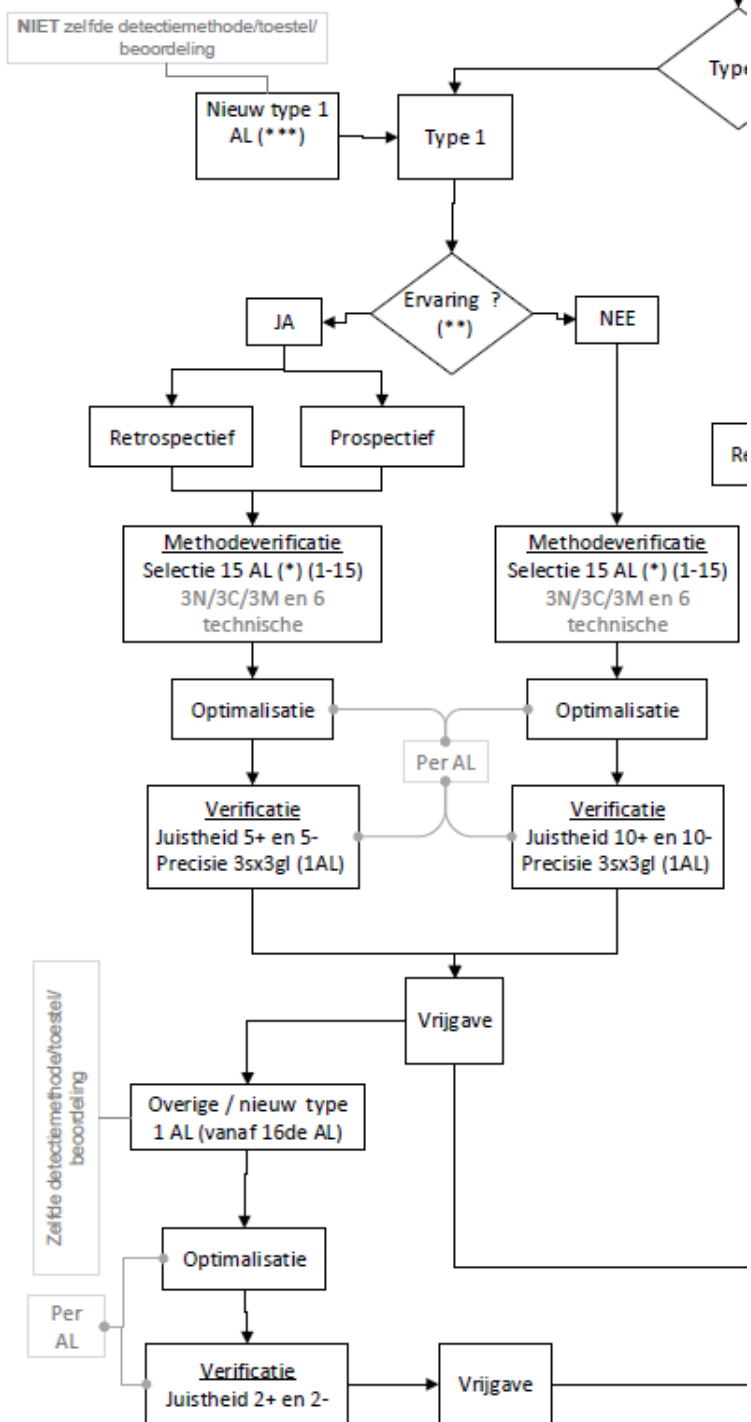


NIET zelfde detectiemethode/toestel/  
beoordeling

Zelfde detectiemethode/toestel/  
beoordeling

Per AL





## (\*) Methodeverificatie

(\*\*) Type 1 : de **ervaring** is voor minstens 8 van de 15 immunohistochemische merkers (waarvan minstens 2 nucleaire, 2 cytoplasmatische, 2 membraanre) objectief retrograad aantoonbaar door bv. optimale of goede EKE-resultaten voor de twee recentste EKE's binnen de voorbije 7 jaar zonder wijziging in kleurpatronen en beoordeling van de geselecteerde antilichamen, traceerbare IQC resultaten over een bepaalde periode (minstens 6 maanden), geen geregistreerde NC's m.b.t. de gebruikte methode/techniek binnen het afgelopen jaar, e.a.

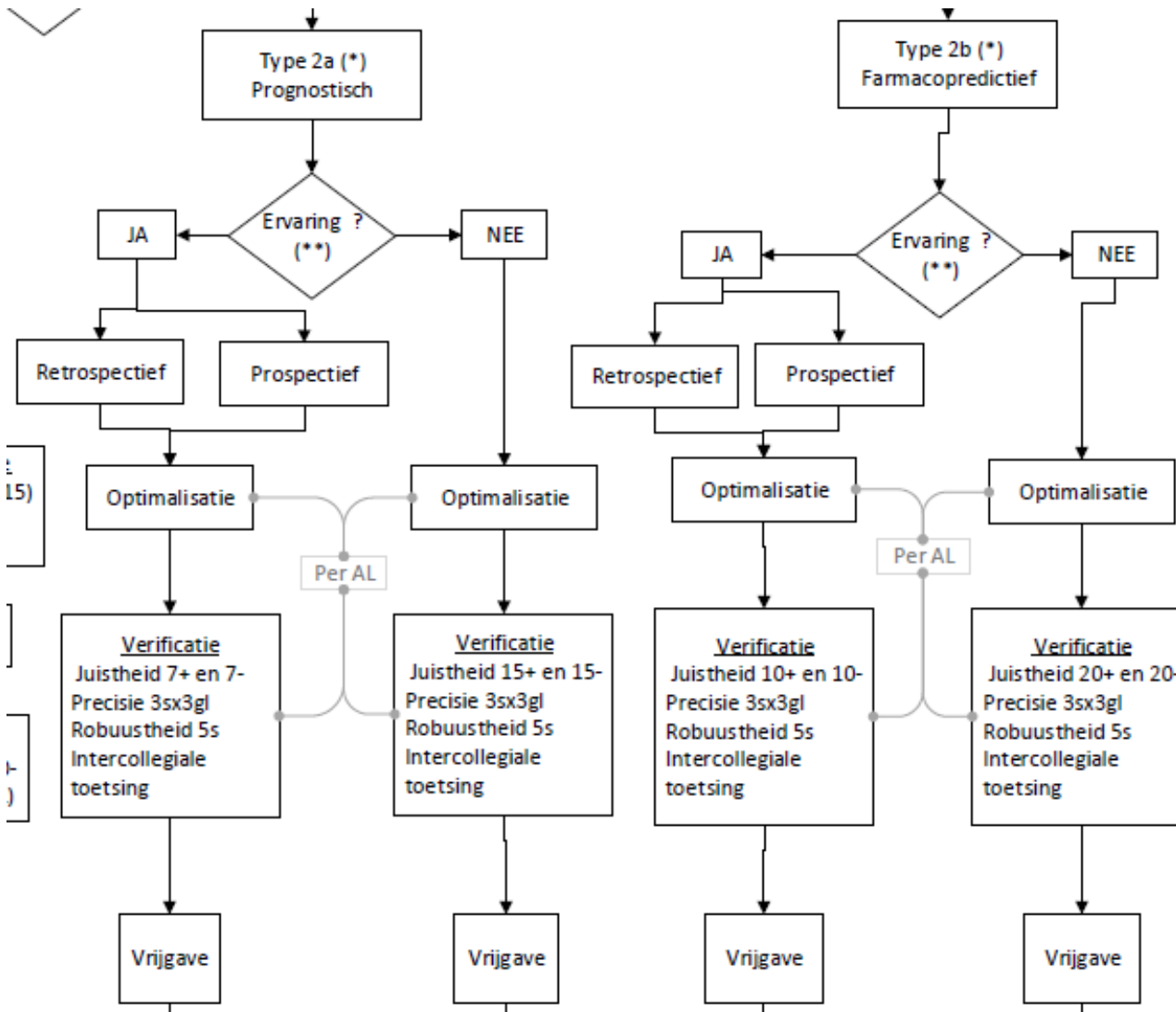
# Verificatie – CE – IVD volgens bijsluiter

## Type 1 IHC:

Andere matrix dan FFPE (bv. cytologische preparaten of vriesmateriaal)

- Indien geverifieerd binnen methodeverificatie:  
3 tot 5 positieve en 3 tot 5 negatieve stalen
- Indien niet geverifieerd binnen methodeverificatie:  
10 positieve en 10 negatieve stalen

# Verificatie – CE – IVD volgens bijsluiter



(\*\*) Type 2 : de ervaring is per merker aantoonbaar door deelname aan minstens 2 opeenvolgende EKE's met optimale of goede EKE-resultaten.

# Verificatie – CE – IVD volgens bijsluiter

## CE-IVD volgens bijsluiter of CE-IVD Off label MET referentie

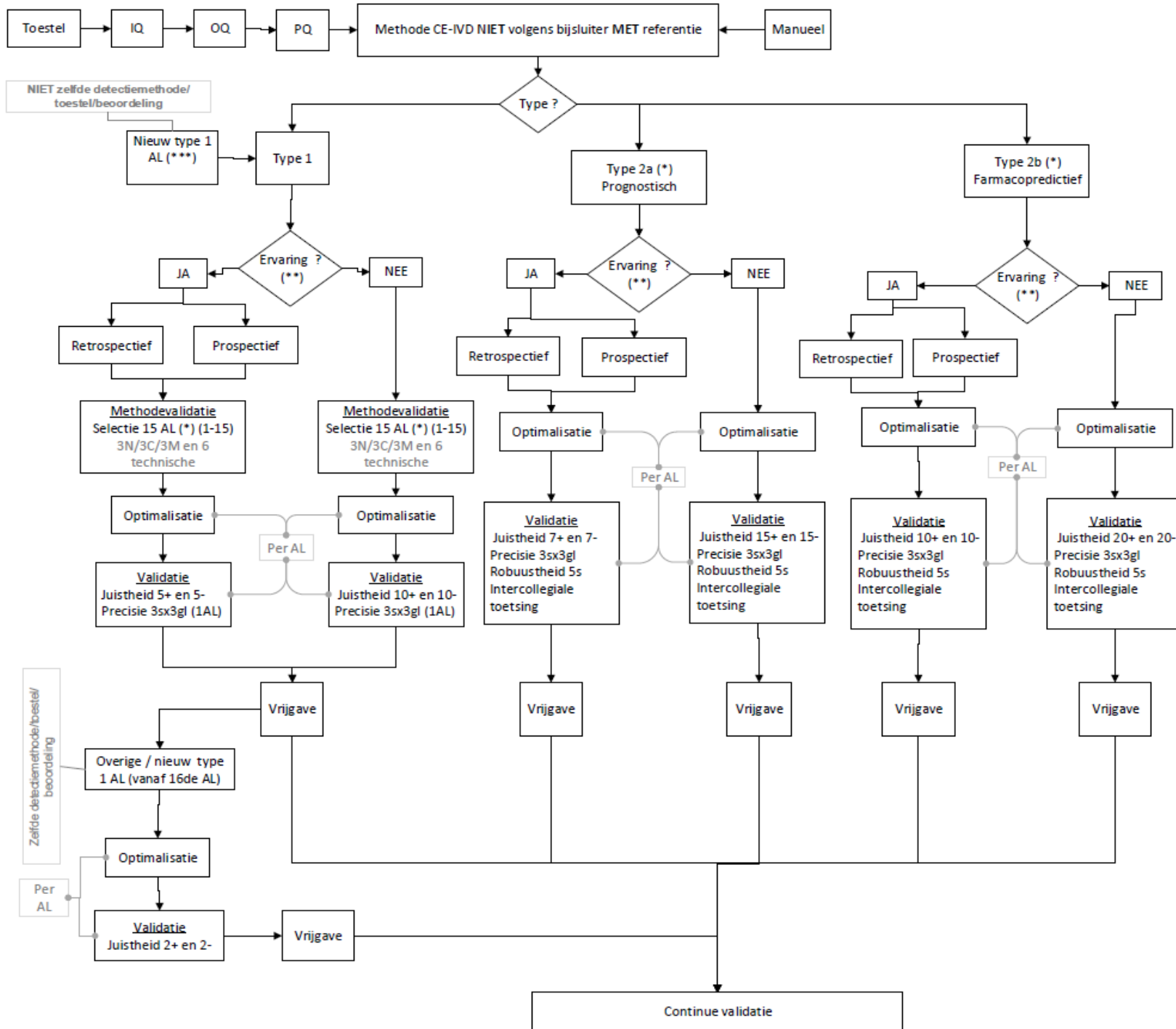
INITIEEL MET ERVARING OF HISTORISCH						INITIEEL ZONDER ERVARING					
Type 2 IHC	Juistheid	Precisie		Robuustheid	Andere		Juistheid	Precisie		Robuustheid	Andere
		Intra	Inter					Intra	Inter		
Ander weefsel type	5s (+) 5s (-)	3s x 3gl	3s x 3gl	5s(+) 5s(-)	I/U/S/A/T : > X 5s(+) en 5(s-) interobserver	Ander weefsel type	10s (+) 10s (-)	3s x 3gl	3s x 3gl	5s(+) 5s(-)	I/U/S/A/T : > X 5s(+) en 5(s-) interobserver
AC	≥ 90%	≥ 90%	≥ 90%	≥ 90%	≥ 90%	AC	≥ 90%	≥ 90%	≥ 90%	≥ 90%	≥ 90%
≠ FFPE	3s (+) 3s (-)	3s x 3gl	3s x 3gl	3s(+) 3s(-)	I/U/S/A/T : > X 3s+ en 3s- interobserver	≠ FFPE	5s (+) 5s (-)	3s x 3gl	3s x 3gl	5s(+) 5s(-)	I/U/S/A/T : > X 5s(+) en 5s(-) interobserver
AC	> 83%	> 90%	≥ 90%	≥ 83%	≥ 83%	AC	≥ 90%	≥ 90%	≥ 90%	≥ 95%	≥ 90%

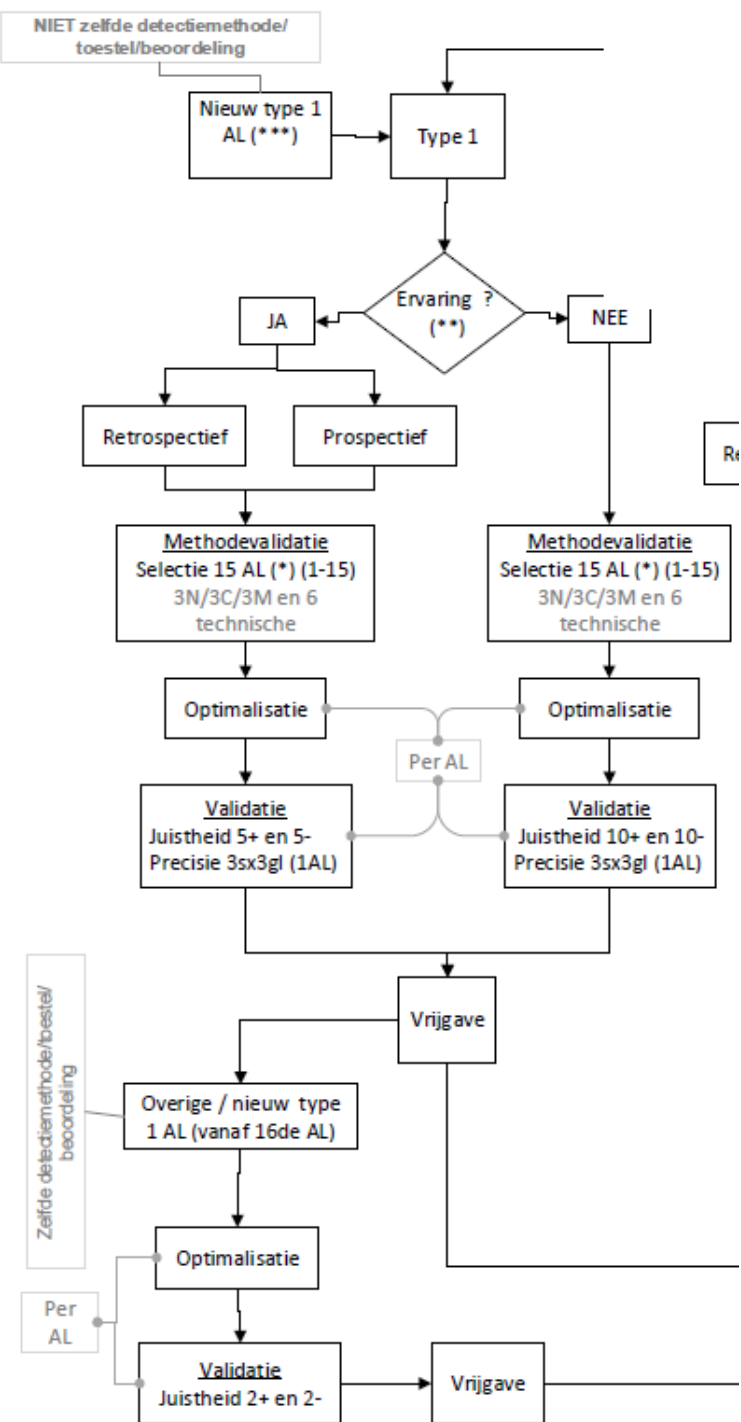


# Validatie: CE-IVD off-label met referentie

## Voorbeelden:

- CE-IVD kit of reagens, niet volgens de bijsluiter (buiten de specificaties van de fabrikant) bv. langere of kortere incubatietijd antilichaam, verdunningsfactor antilichaam buiten de range zoals opgegeven door de fabrikant, andere detectiemethode, andere voorbehandeling, enz.
- CE-IVD antilichaam waarbij de gekozen verdunningsfactor afwijkt van de door de fabrikant opgegeven verdunningsfactor (bv. 1:100 door fabrikant vs. 1:200 door laboratorium).
- •Door de applicatiespecialist van de firma wordt aangeraden een afwijkend kleurprotocol toe te passen, dus om af te wijken van de specificaties zoals vermeld in de bijsluiter bv. andere, maar gelijkaardige detectiekit, ander toestel, enz. De door de fabrikant geleverde documentatie (bv. email) met het optimaal protocol telt als referentie.

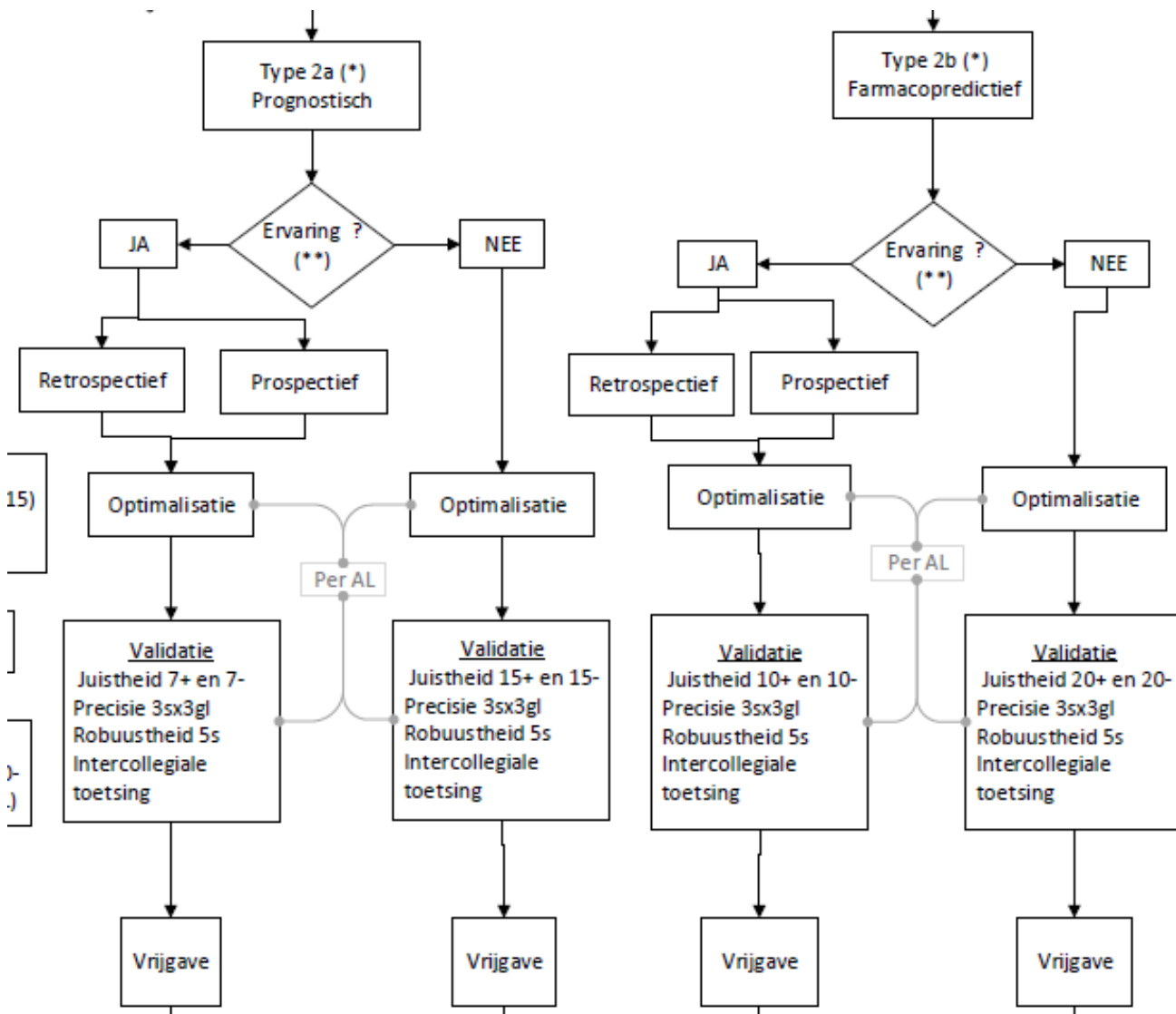




## (\*) Methodeverificatie

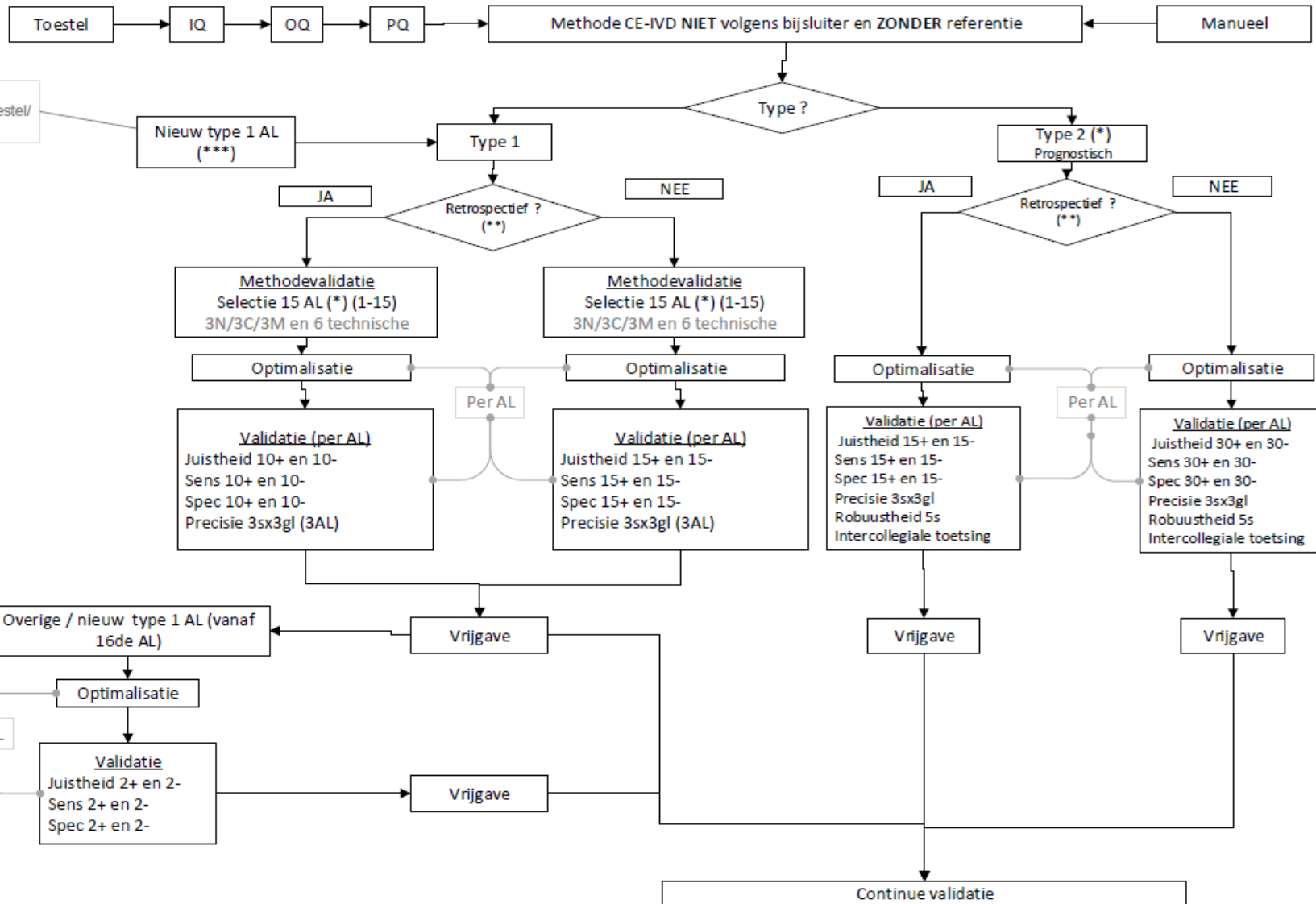
(\*\*) Type 1 : de **ervaring** is voor minstens 8 van de 15 immunohistochemische merkers (waarvan minstens 2 nucleaire, 2 cytoplasmatische, 2 membraanre) objectief retrograad aantoonbaar door bv. optimale of goede EKE-resultaten voor de twee recentste EKE's binnen de voorbije 7 jaar zonder wijziging in kleurpatronen en beoordeling van de geselecteerde antilichamen, traceerbare IQC resultaten over een bepaalde periode (minstens 6 maanden), geen geregistreerde NC's m.b.t. de gebruikte methode/techniek binnen het afgelopen jaar, e.a.

# Validatie: CE-IVD off-label met referentie



(\*\*) Type 2 : de ervaring is per merker aantoonbaar door deelname aan minstens 2 opeenvolgende EKE's met optimale of goede EKE-resultaten.

# Validatie – CE-IVD off-label zonder referentie



# Validatie: niet CE-IVD met referentie

## Voorbeelden:

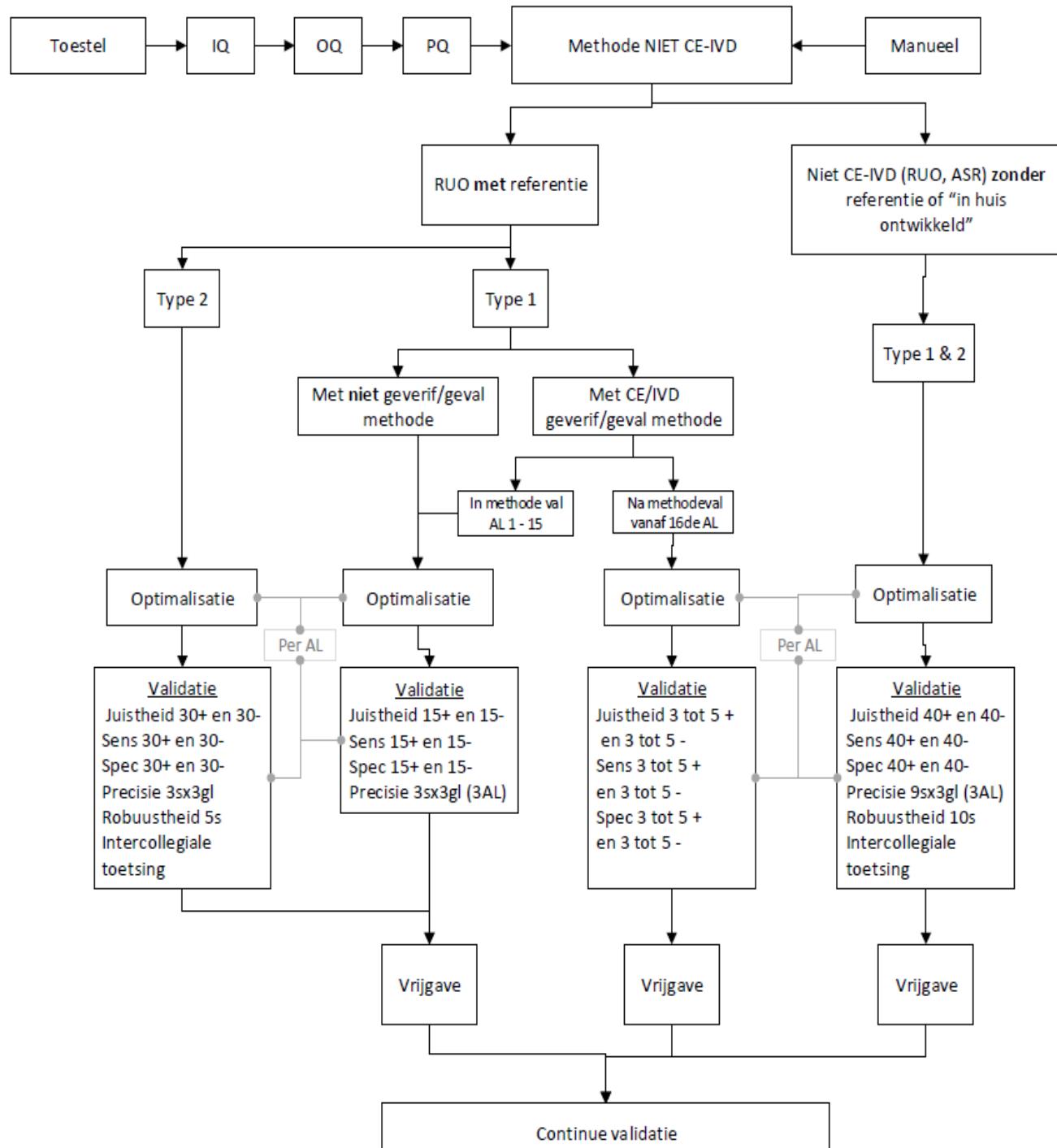
- RUO met bijsluiter
- Niet CE-IVD waarvan het protocol werd overgenomen uit de literatuur of ander laboratorium

# Validatie: niet CE-IVD zonder referentie

## Voorbeelden:

- RUO waarbij wordt afgeweken van de specificaties zoals beschreven in de bijsluiter
- In de bijsluiter van het antilichaam wordt een specifieke detectiekit vermeldt. Het laboratorium beslist om een detectiekit van een andere fabrikant toe te passen.
- Er zijn specifieke vereisten m.b.t. het gebruik van het toestel vermeld in de bijsluiter van de detectiekit. Het laboratorium beslist om de test/kleuring uit te voeren op een ander toestel van dezelfde fabrikant of een toestel van een andere fabrikant.

# Validatie: niet CE-IVD





# Aanvaardbaarheidscriteria

- Objectief – SMART principe
- De te verwachten resultaten: welke weefsel- en celstructen kleuren aan en hoe

# Aanvaardbaarheidscriteria

CE-IVD volgens bijsluiter of CE-IVD Off label MET referentie												
INITIEEL MET ERVARING OF HISTORISCH						INITIEEL ZONDER ERVARING						
	Juistheid	Precisie		Robuustheid	Andere		Juistheid	Precisie		Robuustheid	Andere	
		Intra	Inter					Intra	Inter			
<b>IHC Type 1 panel 15</b>	per AL	5s (+) 5s (-)	3s x 3gl (1 AL)	3s x 3gl (1 AL)		I/U/S/A/T : > X	per AL	10s (+) 10s (-)	3s x 3gl (1 AL)	3s x 3gl (1 AL)		I/U/S/A/T : > X
<b>(methodevalidatie)</b>	AC	≥ 90%	≥ 90%	≥ 90%			AC	≥ 90%	≥ 90%	≥ 90%		
<b>IHC Type 1 overige</b>	per AL	2s (+) 2s (-)				I/U/S/A/T : > X	per AL	2s (+) 2s (-)				I/U/S/A/T : > X
	AC	≥ 75%					AC	≥ 75%				
<b>IHC Type 2a</b>	Initiële matrix	7s (+) 7s (-)	3s x 3gl	3s x 3gl	5s(+) 5s(-)	I/U/S/A/T : > X 5s(+) en 5s(-) interobserver	Initiële matrix	15s(+) 15s (-)	3s x 3gl	3s x 3gl	5s(+) 5s(-)	I/U/S/A/T : > X 5s(+) en 5s(-) interobserver
	AC	≥ 90%	≥ 90%	≥ 90%	≥ 90%	≥ 90%	AC	≥ 93%	> 90%	> 90%	> 90%	> 90%
<b>IHC/ Type 2b</b>	Initiële matrix	10s (+) 10s (-)	3s x 3gl	3s x 3gl	5s(+) 5s(-)	I/U/S/A/T : > X 5s(+) en 5s(-) interobserver	Initiële matrix	20s(+) 20s (-)	3s x 3gl	3s x 3gl	5s(+) 5s(-)	I/U/S/A/T : > X 5s(+) en 5s(-) interobserver
	AC	≥ 90%	≥ 90%	≥ 90%	≥ 90%	≥ 90%	AC	≥ 95%	> 90%	> 90%	> 90%	> 90%

# Beoordeling resultaten

➤ Diagnostische kleuring:

universeel beoordelingssysteem (bv. SAM scoringssysteem)

➤ Prognostische en farmaco-predictieve kleuringen:

specifieke beoordelingscriteria of scoresystemen naast universeel  
beoordelingssysteem

# Beoordeling resultaten

Voorbeeld universeel beoordelingsysteem voor IHC kleuringen

<b>Kleurcriteria</b>	<b>Scorecriteria</b>			
<i>Kleurintensiteit (I)</i>	0 (geen)	1 (zwak)	2 (matig)	3 (sterk)
<i>Uniformiteit (U)</i>	0 (geen)	1 (uniform)	-	-
<i>Specificiteit (S)</i>	0 (geen)	1 (specifiek)	-	-
<i>Afwezigheid Achtergrondkleuring (A)</i>	0 (sterk)	1 (matig)	2 (geen)	-
<i>Tegenkleuring (T)</i>	0 (inadequaaf)	1 (adequaaf)	-	-
<i>Totaal</i>	x	x	x	x

<b>Behaalde score</b>	<b>Criterium</b>
0-4	Onaanvaardbaar
5-6	Borderline
7-8	Optimaal

$$x \geq 7$$

# Hervalidatie

Wijziging	Testmethode	Juistheid	Precisie		Andere
			Intra	Inter	
<b>Soort fixatief</b> <b>Weefseldoorvoering</b> <b>Type paraffine</b> <b>(bv. smeltemperatuur,</b> <b>samenstelling)</b> <b>Watertoevoer</b> <b>(met impact op test)</b>	IHC Type 1 (panel)	N : 2+ en 2- C : 2+ en 2- M : 2+ en 2-	///	///	I/U/S/A/T : $\geq X$
	AC	$\geq 83\%$			
	IHC Type 2 (panel)	N : 5+ en 5- C : 5+ en 5- M : 5+ en 5-	///	///	I/U/S/A/T : $\geq X$
	AC	$\geq 95\%$			
<b>Analysetoestel</b> <b>(zelfde methode)</b>	IHC Type 1	N : 2+ en 2- C : 2+ en 2- M : 2+ en 2-	3s x 3gl (1 AL)	3s x 3gl (1 AL)	I/U/S/A/T : $\geq X$
	AC	$\geq 83\%$	$\geq 90\%$	$\geq 90\%$	
	IHC Type 2	N : 5+ en 5- C : 5+ en 5- M : 5+ en 5-	3s x 3gl (1 AL)	3s x 3gl (1 AL)	I/U/S/A/T : $\geq X$
	AC	$\geq 95\%$	$\geq 90\%$	$\geq 90\%$	

# Hervalidatie

Wijziging	Testmethode	Juistheid	Precisie		Andere
			Intra	Inter	
Omgevingscondities (bv. verhuis intern of extern)	IHC Type 1	mix N/C/M 1+ en 1-	1s x 3gl (1 AL)	1s x 3gl (1 AL)	I/U/S/A/T : $\geq X$
	AC	$\geq 83\%$	$\geq 90\%$	$\geq 90\%$	
	IHC Type 2	mix N/C/M 1+ en 1-	1s x 3gl (1 AL)	1s x 3gl (1 AL)	I/U/S/A/T : $\geq X$
	AC	$\geq 83\%$	$\geq 90\%$	$\geq 90\%$	
Onderhoud/defect toestel (bv. vervanging kritische onderdelen) Update toestelsoftware (met impact)	IHC Type 1	2+ en 2- (1AL)	x	x	I/U/S/A/T : $\geq X$
	IHC Type 2	2+ en 2- (1AL)	x	x	I/U/S/A/T : $\geq X$
	AC	$\geq 75\%$	$\geq 90\%$	$\geq 90\%$	
Verdunningsfactor AL Incubatietijd AL Fabrikant/leverancier ( = kloon) Voorbehandelingstijd Voorbehandelingsmethode (bv. pH, buffer) Incubatietijd detectiesysteem	IHC Type 1	2+ en 2-	///	///	I/U/S/A/T : $\geq X$
	IHC Type 2	2+ en 2-	///	///	
	AC	$\geq 75\%$			

# Continue validatie

- Interne kwaliteitscontroles
- Externe kwaliteitsevaluaties
- Intercollegiale toetsingen (initieel bij de validatie/verificatie en tussentijds in routine, eventueel bij deelname aan EKE)
- Correlatiestudies met een andere methoden (bv. IHC vs. ISH)
- Populatie-onderzoeken
- Registratie van non-conformiteiten bv. afwijkende resultaten
- Uitvoering van een toestel (her)verificatie
- Uitvoering van ingangscntroles van kritische reagentia en verbruiksartikelen