

Raccomandazioni per Accredimento ISO 15189 del laboratorio medico: processi di esame, validità dei risultati degli esami

Recommendations for Medical Laboratory ISO 15189 Accreditation: Examination Processes, Validity of Examination Results

Codifica di questo documento:

Flusso Operativo	Elementi fondamentali del sistema qualità	
Preesame Richiesta di esame A	Documenti e Registri L	
Prelievo B	Organizzazione M	
Trasporto del campione C	Personale N	
Accettazione e trattamento del campione D	Strumentazione O	
Esame E	Acquisti e gestione scorte P	
Revisione e flusso dei risultati F	Controllo del processo Q	#
Interpretazione di laboratorio G	Gestione delle informazioni R	
Postesame Trasmissione e archiviazione del risultato H	Gestione degli inconvenienti S	
Conservazione e smaltimento del campione I	Verifiche T	
	Miglioramento del processo U	
	Servizio e Soddisfazione V	
	Impianti e sicurezza Z	



Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio

Componente della *World Association of Societies of Pathology
and Laboratory Medicine* www.sipmel.it

Certificazione ISO



Commissione Nazionale Qualità ed Accreditamento
Gruppo di Studio Informatica *Coordinatore: Marco Pradella*
Gruppo di Studio sul Management sanitario
Coordinatore: Giovanni Casiraghi

documento Q19
validità risultati
*Approvato dal Consiglio Nazionale
del 27/2/2024 - Versione 1.0*

Riferimenti normativi

UNI EN ISO 15189:2023. Laboratori medici - Requisiti riguardanti la qualità e la competenza.

UNI EN ISO 22367:2020. Laboratori medici - Applicazione della gestione del rischio ai laboratori medici

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018. Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura

ISO 15198:2004. Clinical laboratory medicine, In vitro diagnostic medical devices. Validation of user quality control procedures by the manufacturer.

UNI ISO/TS 20914:2023. Laboratori medici - Guida pratica per la stima dell'incertezza di misura

Joint Commission for Guides in Metrology (JCGM) International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM) 3rd edition.

ISO/IEC Guide 99:2007. International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM)

UNI CEI 70099:2008. Vocabolario Internazionale di Metrologia - Concetti fondamentali e generali e termini correlati (VIM)

UNI ISO 20397-2:2022. Biotecnologie - Sequenziamento massivo parallelo - Parte 2: Valutazione della qualità dei dati di sequenziamento

UNI ISO 17822:2023. Sistemi di test diagnostici in vitro - Procedure di esame basate sull'amplificazione degli acidi nucleici - Guida pratica per la qualità nei laboratori

UNI EN ISO 17511:2021. Dispositivi medico-diagnostici in vitro - Requisiti per stabilire la tracciabilità metrologica dei valori assegnati ai calibratori, ai materiali di controllo della correttezza e campioni umani

ISO/TS 16393:2019. Molecular biomarker analysis — Determination of the performance characteristics of qualitative measurement methods and validation of methods.

UNI ISO/TR 27877:2021. Analisi statistica per valutare la precisione dei metodi di misurazione binari e i loro risultati

INDICE

Codifica di questo documento:.....	1
Riferimenti normativi.....	2
Introduzione: la revisione di ISO 15189.....	5
NOTA di ortografia.....	6
Garantire la validità dei risultati degli esami.....	7
Controllo di qualità interno (CQI).....	7
NOTA su CQI e incertezza.....	8
NOTA su ISO 15188 e CLSI C24.....	8
Materiali per il CQI.....	9
NOTA su materiali di controllo.....	9
NOTA su controlli per immunometria e immunoistochimica.....	11
NOTA su controlli per microbiologia.....	11
NOTA su controlli per metodi molecolari.....	13
NOTA su controlli per esami POCT.....	20
NOTA su risultati qualitativi.....	22
NOTA su confronto di metodi.....	23
NOTA su alternative al CQI con controlli.....	23
NOTA su CQI con media mobile.....	24
NOTA su CQI con ripetizione di esami.....	24
Frequenza e procedure per il CQI.....	26
NOTA su regole e frequenza dei controlli.....	26
NOTA su CQI e rilascio dei risultati.....	26
Commento generale ai requisiti del CQI secondo ISO 15189.....	27
Valutazione esterna della qualità (VEQ).....	29
NOTA su VEQ e rischio.....	29
NOTA su alternative a VEQ.....	30
NOTA su esami molecolari e VEQ.....	31
Commento generale ai requisiti di VEQ secondo ISO 15189.....	33
Comparabilità dei risultati degli esami.....	35
NOTA su confronto di metodi.....	35
NOTA su comparazione con risultati di pazienti secondo CLSI EP31.....	37
NOTA su comparazione con risultati di pazienti secondo CLSI EP09 e guida SIPMeL.....	40
Commento generale alla comparazione dei risultati secondo ISO 15189.....	40
Conclusioni e raccomandazioni.....	41
Tabella. Materiali per il CQI e per la stima di precisione.....	46



Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio

Componente della *World Association of Societies of Pathology
and Laboratory Medicine* www.sipmel.it

Commissione Nazionale Qualità ed Accredimento
Gruppo di Studio Informatica *Coordinatore: Marco Pradella*
Gruppo di Studio sul Management sanitario
Coordinatore: Giovanni Casiraghi

Certificazione ISO



documento Q19
validità risultati
*Approvato dal Consiglio Nazionale
del 27/2/2024 - Versione 1.0*

Introduzione: la revisione di ISO 15189

SIPMeL ha già affrontato il tema del controllo di qualità con il documento Q11P1, sviluppato in base a ISO 15198, ora in revisione.^{1,2,3,4} Si deve tornare sull'argomento alla luce della revisione della norma ISO per l'accreditamento dei laboratori medici.

La norma ISO 15189 revisionata è stata pubblicata il 6 dicembre 2022, quasi un anno dopo il termine previsto, e recepita da UNI in Italia poco tempo dopo.⁵ Il processo di revisione è stato lungo e faticoso, iniziato già in ottobre 2018⁶ ha attraversato molteplici versioni della bozza e altrettante votazioni. Dai vertici ISO e del Comitato tecnico competente (ISO/TC 212) sono state ricevute, tra le altre, alcune importanti direttive: usare ISO/IEC 17025:2017 come modello, incorporare ISO 22870 (la norma per i Point-of-care), stabilire collegamenti con ISO 15190 (salute e sicurezza), ISO 22367 (gestione dei rischi) e ISO/TS 20658 (fase preesame), ridurre i requisiti prescrittivi ma basarsi sul rischio per il paziente, prendere in considerazione altri documenti ISO pubblicati pertinenti, con l'obiettivo di evitare anche ripetizioni ridondanti, sincronizzando le clausole pertinenti in ISO 15190, ISO 22367, ISO TS 20658, ISO 17511 (taratura), ISO TS 20914 (incertezza di misura) e la serie di standard diagnostici molecolari sviluppato da ISO TC 212 WG4. Il risultato è stato la presenza dei POCT in quasi tutti i capitoli e una appendice normativa di ISO 15189 sulla gestione dei POCT.

Tuttavia, le innovazioni chieste da ISO si sono scontrate nel processo di revisione con non poche resistenze, con il risultato della presenza nel testo finale di diversi compromessi, potenziali difficoltà per laboratori medici e ispettori di accreditamento.⁷ Un particolare impegno a laboratori e ispettori è richiesto dalla disposizione di collegare ISO 15189 a numerosi altri documenti ISO pertinenti, al fine di evitare ridondanze.

In questa nota di raccomandazioni vengono presentati alcuni punti salienti di UNI EN ISO 15189:2023 nel capitolo 7 (Requisiti di processo), in particolare nella clausola 7.3 Processi di esame, il punto 7.3.7

¹ SIPMeL. documento Q11P1 raccomandazioni ISO 15198 e controllo di qualità.

<https://www.sipmel.it/it/risorse/gruppi/documenti/documento/114668>

² Pradella M. Produttore di diagnostici e laboratorio medico alleati per il controllo di qualità dei risultati: ritardi e novità. *La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio* 2020 marzo;16(1):73-7
DOI: 10.23736/S1825-859X.19.00025-2

³ Pradella M. Alliance of IVD manufacturer and medical laboratory for quality control of results. *Advances in Laboratory Medicine / Avances en Medicina de Laboratorio*, vol. 2, no. 1, 2021, pp. 137-138. <https://doi.org/10.1515/almed-2020-0079>

⁴ ISO 15198:2004. Clinical laboratory medicine, In vitro diagnostic medical devices. Validation of user quality control procedures by the manufacturer. Reviewed and confirmed in 2018.

⁵ UNI EN ISO 15189:2023. Laboratori medici - Requisiti riguardanti la qualità e la competenza.
Data disponibilità: 02 marzo 2023

⁶ Pradella M. Requisiti dei laboratori medici, forensi, antidoping e alimentari: nuove ISO 15189 e ISO 17025. *La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio* 2019 dicembre;15(4):252-62. DOI: 10.23736/S1825-859X.19.00033-1

⁷ Pradella M. New ISO standards for medical biology laboratories, prescriptions and deviations. Volume 80, issue 5, September-October 2022. *Annales de Biologie Clinique*. 2022;80(5):451-453. doi:10.1684/abc.2022.1755

Garantire la validità dei risultati degli esami, che contiene ... 7.3.7.2 Controllo di qualità interno (CQI), 7.3.7.3 Valutazione esterna della qualità (VEQ), 7.3.7.4 Comparabilità dei risultati degli esami. Dopo la pubblicazione del documento ISO 20914⁸, il CQI ha assunto una valenza molto più ampia del semplice monitoraggio quotidiano della validità dei risultati, diventando la base per la stima dell'incertezza di misura nei laboratori medici. Le modalità per realizzare il CQI, la scelta dei materiali, la frequenza, le statistiche, meritano perciò una particolare attenzione aggiuntiva in tutti i settori del laboratorio medico.

NOTA di ortografia.

Come descritto dalla Accademia della Crusca,⁹ la lingua italiana si comporta diversamente dall'inglese. Per i prefissati con anti-, auto-, pre-, vice- i dizionari mostrano la tendenza a mantenere il trattino solo per gli anglismi. Il trattino si mostra più resistente nelle formazioni del tipo post- + nome, in particolare con termini specialistici. Tuttavia, Treccani¹⁰ elenca numerosi esempi senza trattino (postpliocene, postmoderno, postoperatorio, postbellico, postludio, postmaturo, postdiluviano, postdatare), decisamente più eleganti in italiano. Anche il Dizionario De Mauro riporta esempi di parole senza trattino: prelavaggio, prenatale, presalario, presenile, prescientifico, prefrontale.¹¹ Ma anche: postbellico, postindustriale, postoperatorio, postrisorgimentale, postcomunismo.¹²

In questo documento, perciò, si preferirà l'atteggiamento prescrittivo di Treccani e De Mauro a quello descrittivo della Crusca e verranno usati i termini "preesame" e "postesame".

Si cercheranno inoltre di evitare per quanto possibile anglicismi e usi errati di falsi amici inglesi della lingua italiana. Si prenderanno come ispirazioni le soluzioni individuate da lingue romanze come la lingua francese e quella spagnola.

Per esempio, il verbo "implement" viene sovente erroneamente ricalcato nella lingua italiana con il significato di "aumentare, migliorare". Ancora, la categoria "pre-analytical" viene talvolta ricalcata erroneamente con il significato di "trattamento preparatorio" di una fase del processo di esame, quando si tratta di una sequenza articolate, generando un'ambiguità ulteriore con i processi preesame, che invece si riferiscono al prelievo e al trasporto del campione in laboratorio.

Aggiuntiva alla nota ambiguità tra attività di "misura" e quelle di "analisi", bene esposta nel Vocabolario Internazionale.

⁸ ISO/TS 20914:2019. Medical laboratories — Practical guidance for the estimation of measurement uncertainty. Ginevra: International Organization for Standardization; 2019.

⁹ Raffaella Setti. Il trattino: quando usarlo? Redazione Consulenza Linguistica Accademia della Crusca 2009. <https://accademiadellacrusca.it/it/consulenza/il-trattino-quando-usarlo/249>

¹⁰ Istituto della Enciclopedia Italiana fondata da Giovanni Treccani. Pòst- Vocabolario on line. <https://www.treccani.it/vocabolario/post/>

¹¹ Nuovo De Mauro. Pre- <https://dizionario.internazionale.it/parola/pre->

¹² Nuovo De Mauro. Post- <https://dizionario.internazionale.it/parola/post->

Garantire la validità dei risultati degli esami

UNI EN ISO 15189:2023 al punto 7.3.7 chiede perentoriamente che il laboratorio disponga di una procedura per monitorare la validità dei risultati. I dati risultanti devono essere registrati in modo tale che le tendenze e i cambiamenti siano rilevabili e, ove possibile, si applicano tecniche statistiche per rivedere i risultati. Questo monitoraggio deve essere pianificato e rivisto. Quindi, i quattro pilastri della validità dei risultati sono: monitoraggio, documentazione, statistica, pianificazione e revisione.

Controllo di qualità interno (CQI)

Al punto 7.3.7.2 di ISO 15189 si esprimono i principi generali. Il laboratorio deve avere una procedura CQI per monitorare in permanenza la validità dei risultati degli esami, che verifichi il raggiungimento della qualità prevista e garantisca la validità pertinente al processo decisionale clinico. Quindi servono procedura, previsioni di qualità, collegamento clinico.

NOTA su CQI e incertezza.

Dopo la pubblicazione di ISO 20914¹³ il controllo di qualità interno assume una valenza che va oltre il monitoraggio dei risultati degli esami, ma diventa base per la stima dell'incertezza di misura. Dove, a differenza di ISO 17025, l'incertezza strumentale della misura viene scorporata da quella dei processi preesame e dei processi postesame.

Le specifiche prestazionali per lo stesso misurando possono differire in diversi contesti clinici. La procedura dovrebbe inoltre consentire il rilevamento della variazione del reagente o del calibratore da lotto a lotto, o di entrambi; quindi, dovrebbe evitare il cambio di lotto nel materiale CQI nello stesso giorno o nella stessa seduta del cambio del lotto di reagente o del calibratore. L'uso di materiale CQI di terze parti dovrebbe essere considerato in alternativa o in aggiunta al materiale di controllo fornito dal produttore del reagente o dello strumento.

Il monitoraggio delle interpretazioni e delle opinioni può essere ottenuto attraverso una regolare revisione tra pari dei risultati degli esami.

¹³ UNI ISO/TS 20914:2023. Laboratori medici - Guida pratica per la stima dell'incertezza di misura

NOTA si ISO 15198 e CLSI C24.

In ossequio alle direttive ISO, la norma enuncia alcuni principi sulla procedura del CQI, senza specificarne dettagli e riferimenti.

I laboratori medici hanno invece due riferimenti principali da considerare, uno ISO e uno CLSI: ISO 15198¹⁴ e CLSI C24¹⁵. A questi va affiancata la precisione lessicale del Vocabolario internazionale di metrologia VIM.¹⁶

ISO 15198 ci dice che sebbene i direttori dei laboratori abbiano la responsabilità ultima di determinare le procedure di controllo della qualità appropriate per i loro laboratori, i produttori di dispositivi medici IVD hanno la responsabilità di fornire agli utenti informazioni adeguate sulle prestazioni dei dispositivi, nonché un mezzo per controllare i rischi e verificare le prestazioni nel rispetto delle specifiche.^{17, 18, 19} In pratica, quindi, il controllo di qualità è una responsabilità condivisa tra produttori e utilizzatori di dispositivi medici IVD. Il fabbricante deve stabilire se è necessaria la validazione del CQI, in base ai risultati dell'analisi dei rischi, ovvero se il fallimento del sistema di CQI costituisca un vero pericolo per i pazienti o se un CQI fosse misura precauzionale per mitigare il rischio a un livello accettabile. Per i dispositivi medici IVD esistenti, le procedure convenzionali di controllo statistico della qualità (ad esempio, quelle descritte nel documento CLSI C24) sono considerate adeguate. Invece, se la valutazione dei rischi indica che le procedure di CQI sono essenziali, le procedure di CQI devono essere validate.

Le procedure di CQI validate devono includere per ISO 15198: il tipo di scostamento che la procedura di controllo della qualità è destinata a rilevare, i materiali di controllo che possono essere utilizzati, le concentrazioni di misurando raccomandate, le linee guida per i limiti di controllo, le limitazioni note della procedura di CQI.

CLSI C24 contiene un riferimento diretto a ISO 15189, fornisce agli specialisti dei laboratori

¹⁴ ISO 15198:2004, Clinical laboratory medicine — In vitro diagnostic medical devices — Validation of user quality control procedures by the manufacturer

¹⁵ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions. 4th ed. CLSI guideline C24 (ISBN 1-56238-946-7 [Print]; ISBN 1-56238-947-5 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2016.

¹⁶ Joint Commission for Guides in Metrology (JCGM) International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM) 3rd edition.

¹⁷ Commissione SIPMeL Qualità Accredimento. Q11P1 Raccomandazioni per il controllo di qualità interno: compiti del produttore di diagnostici in vitro. 20/03/2019. <https://www.sipmel.it/it/risorse/gruppi/documenti/documento/114668>

¹⁸ Pradella M. Produttore di diagnostici e laboratorio medico alleati per il controllo di qualità dei risultati: ritardi e novità. La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio 2020 Marzo;16(1):73-7 DOI: 10.23736/S1825-859X.19.00025-2

¹⁹ Pradella M. Alliance of IVD manufacturer and medical laboratory for quality control of results. Advances in Laboratory Medicine / Avances en Medicina de Laboratorio, vol. 2, no. 1, 2021, pp. 137-138. <https://doi.org/10.1515/almed-2020-0079>

medici una guida pratica su come soddisfare le raccomandazioni delle autorità e/o delle organizzazioni di accreditamento. Spiega lo scopo del CQ statistico per le misure quantitative, descrive un approccio per la pianificazione di una strategia di CQ, descrive l'uso del materiale e dei dati CQ e fornisce esempi che dimostrano un processo pratico di pianificazione del CQ per i laboratori medici.

CLSI C24 non tratta alcuni temi: risultati qualitativi, CQI con i dati dei pazienti, la variabilità preesistente, una variabilità intrinseca del singolo campione (viscosità, trascinamento, influenze di interferenti).

Materiali per il CQI.

Per ISO 15189 il laboratorio dovrà selezionare il materiale CQI adatto allo scopo previsto, considerando i seguenti fattori: stabilità rispetto alle proprietà di interesse, matrice più simile possibile a quella dei campioni dei pazienti, comportamento nel metodo di esame in modo quanto più vicino possibile ai campioni dei pazienti, impegno clinicamente rilevante per il metodo di esame, con livelli di concentrazione pari o prossimi ai limiti di decisione clinica e, quando possibile, copertura dell'intervallo di misurazione del metodo di esame. La Tabella 1 raccoglie le indicazioni per i materiali di controllo da documenti ISO, CLSI e WHO.

NOTA su materiali di controllo.

Anche in questo caso, in ossequio alle direttive ISO, la norma enuncia alcuni principi sui materiali di controllo, senza specificarne dettagli e riferimenti.

CLSI C24 distingue materiali di controllo prodotti e forniti dal produttore della procedura di misurazione, prodotti da terzi per il produttore, prodotti da terzi indipendenti, prodotti dal laboratorio mescolando campioni di pazienti o altri materiali preparati in laboratorio, infine gli stessi calibratori, purché con numero di lotto diverso. CLSI include nel C24 i metodi con risultati finali nominali qualitativi (positivo o negativo) che derivano da una misura numerica quantitativa, mentre scarta la possibilità di usare valore assegnato e dispersione comunicati dal produttore con l'inserito informativo.



Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio

Componente della World Association of Societies of Pathology
and Laboratory Medicine www.sipmel.it

Certificazione ISO



Commissione Nazionale Qualità ed Accredimento
Gruppo di Studio Informatica Coordinatore: Marco Pradella
Gruppo di Studio sul Management sanitario
Coordinatore: Giovanni Casiraghi

documento Q19
validità risultati
Approvato dal Consiglio Nazionale
del 27/2/2024 - **Versione 1.0**

NOTA su controlli per immunometria e immunoistochimica.

Il modello della chimica clinica con risultati numerici quantitativi derivanti direttamente dalle misurazioni strumentali è quello più studiato ed elaborato per il CQ. L'attività dei laboratori medici si articola tuttavia in un ventaglio di metodi e possibili risultati, a rischio di finire trascurati dalle norme e dalle linee guida. Tra questi troviamo gli esami di immunometria. CLSI descrive nel documento I/LA02 gli esami in immunofluorescenza e immunoenzimatica.²⁰ Qui sono previsti controlli negativi e positivi a titolo basso, unitamente a campioni conservati di pazienti, le cui differenze di risultato sono in termini di concordanza o discordanza. Ma anche la frequenza di alcuni risultati (negativo, dubbio o positivo) ha un valore per il controllo di qualità. Secondo CLSI I/LA23 (radioimmunologia e immunoenzimatica, confermato nel 2015 ma non più revisionato dopo il 2016)²¹ ai campioni con risultati numerici si affiancano parametri di funzionamento della misurazione, un concetto che si ritroverà in altri campi come la genomica. CLSI I/LA28 si occupa della garanzia di qualità per il controllo della progettazione e la realizzazione di esami immunoistochimici²² e contiene molti spunti di grande interesse per la generalità dei laboratori, non solo per l'ambito ristretto dell'immunoistochimica. Oltre alla proposta di dispositivi contenenti tessuti di controllo (Micromatrici tessutali standardizzati, TMA), è interessante l'approccio alla valutazione dei risultati come conteggio dei valori ordinali, o nominali se viene applicata una soglia. Con questi conteggi vengono realizzati gli esperimenti di stima della precisione, ripetibilità e riproducibilità.

²⁰ CLSI I/LA02. Quality Assurance of Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens: (1) Indirect Fluorescence Assay for Microscopy and (2) Microtiter Enzyme Immunoassay Methods, 2nd Edition. March 22, 2006

²¹ CLSI I/LA23-A. Assessing the Quality of Immunoassay Systems: Radioimmunoassays and Enzyme, Fluorescence, and Luminescence Immunoassays; Approved Guideline. CLSI document I/LA23-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004.

²² CLSI I/LA28-A2. Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document I/LA28-A2### (ISBN 1-56238-000-0###). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2009.

NOTA su controlli per microbiologia.

La microbiologia è un settore importante del laboratorio medico.

CLSI M27M44S²³ e CLSI M27²⁴ trattano controlli di qualità che danno risultati numerici quantitativi, come la misura di concentrazione minima inibitoria (MIC) a partire da diametri in millimetri o entità della riduzione della crescita visibile, valutata con una scala ordinale da 0, otticamente limpido, a 4, nessuna riduzione della crescita visibile. I controlli sono quotidiani, a meno che non si abbia evidenza di stabilità che consenta la riduzione della frequenza.

CLSI M22 (terreni di coltura) prevede l'uso di organismi di controllo della qualità disponibili presso l'American Type Culture Collection (ATCC®), disponibili anche da fonti commerciali, oppure organismi precedentemente caratterizzati, isolati da pazienti e di cui è stata dimostrata la stabilità fenotipica. Non è prevista una statistica dei risultati a scopo interno del laboratorio. Questa attività non ha le caratteristiche del monitoraggio, ma piuttosto quelle di misure preventive per selezionare e tarare i reagenti, in questo caso i terreni di coltura.

Analogamente, CLSI M35 (identificazione di batteri e lieviti) fornisce un dettagliato elenco di controlli per ciascuna procedura biochimica (da prova dell'indolo a prova dell'ureasi), ma anche in questo caso il risultato è del tipo "passa/non passa" e comporta, se negativo, la sostituzione del reagente. Mancano quindi le caratteristiche essenziali per il monitoraggio.

Anche il documento CLSI M40 (sistemi di trasporto microbiologico) prevede l'uso di ceppi standard per la verifica dei nuovi dispositivi, ma non una sorveglianza continua in laboratorio. Lo stesso si può dire per il documento CLSI M50 per il controllo dei sistemi commerciali di identificazione, finalizzato alla loro selezione, non al monitoraggio.²⁵

CLSI M58 non fa eccezione.²⁶ I controlli positivi sono costituiti da ceppi ben caratterizzati scelti dal produttore per dimostrare che lo spettrometro di massa e i sistemi correlati (programmi e database) funzionano secondo le specifiche, che i reagenti consumabili e i vetrini o le piastre di destinazione sono adeguati a supportare l'analisi e che le operazioni del tecnico sono eseguiti con competenza. Il risultato è quindi del tipo "passa/non passa", non fornisce informazioni per le statistiche di

²³ CLSI M27M44S. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3rd ed. CLSI supplement M27M44S. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2022

²⁴ CLSI M27. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017

²⁵ CLSI M50. Quality Control for Commercial Microbial Identification Systems; Approved Guideline. CLSI document M50-A (ISBN 1-56238-675-1). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2008.

²⁶ CLSI M58. Methods for the Identification of Cultured Microorganisms Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. 1st ed. CLSI guideline M58. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017



Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio

Componente della World Association of Societies of Pathology
and Laboratory Medicine www.sipmel.it

Certificazione ISO



Commissione Nazionale Qualità ed Accredimento
Gruppo di Studio Informatica Coordinatore: Marco Pradella
Gruppo di Studio sul Management sanitario
Coordinatore: Giovanni Casiraghi

documento Q19
validità risultati
Approvato dal Consiglio Nazionale
del 27/2/2024 - **Versione 1.0**

monitoraggio. La letteratura scientifica, tuttavia, descrive diverse caratteristiche strumentali potenzialmente utili per la definizione metrologica dell'esame MALDI-TOF, come numero di masse di marcatori rilevate, riproducibilità tra repliche (in percentuale) e scostamento di misurazione in parti per milione (ppm).²⁷ Probabilmente la maturazione della tecnologia consentirà la definizione del monitoraggio della qualità e dell'incertezza di misura.

È interessante invece lo schema proposto dal documento Q2 di UK Standards for Microbiology Investigations,²⁸ dove si prevede di esaminare in parallelo due aliquote di campione, in cieco, registrare i risultati e analizzarli in modo da poter identificare problemi o tendenze ricorrenti. Questa procedura si presta alla produzione di frequenze per la stima degli errori di identificazione microbiologica.

²⁷ Cuénod A, Aerni M, Bagutti C, et al. Quality of MALDI-TOF mass spectra in routine diagnostics: results from an international external quality assessment including 36 laboratories from 12 countries using 47 challenging bacterial strains. Clin Microbiol Infect. 2023;29(2):190-199. DOI: 10.1016/j.cmi.2022.05.017

²⁸ UK Standards for Microbiology Investigations. Quality Guidance Q 2 Issue no: 8 Issue date: 23.07.21. Quality assurance in the diagnostic infection sciences laboratory

NOTA su controlli per metodi molecolari.

Nel laboratorio medico vanno diffondendosi esponenzialmente i metodi molecolari.

CLSI MM01 descrive gli esami molecolari per la genetica ereditaria e l'identificazione dei campioni.²⁹ MM01 sottolinea che i sistemi per esami molecolari sono molto diversi e, nonostante siano disponibili autorevoli linee guida per le caratteristiche prestazionali, i criteri devono essere adattati al sistema in uso. Certamente vanno controllate quantità e la qualità degli acidi nucleici isolati. I documenti CLSI MM13³⁰ e MM23³¹ descrivono i metodi di base a questo scopo per le procedure molecolari. La Tabella 15 di MM01 elenca i diversi tipi di controlli da usare: estrazione, interno, vuoto, negativo, positivo, LLoD, quantitativo, endonucleasi.

CLSI MM03 si occupa dei Metodi molecolari per le malattie infettive, risale al 2015, confermato fino al 2020, non più sottoposto a revisione ma mantenuto nel catalogo CLSI.³² Prevede controlli costituiti da aggiunta di marcatore bersaglio, controlli modificati del bersaglio, controlli eterologhi. La quantità aggiunta al campione comunque deve essere vicina al limite di rilevazione (LoD). Il materiale di controllo positivo può essere semplice, come gli acidi nucleici bersaglio purificati e diluiti in serie in acqua priva di deossiribonucleasi (DNasi)/ribonucleasi (RNasi) (o tampone appropriato), campioni surrogati o campioni di pazienti che contengono notoriamente gli acidi nucleici bersaglio. Alcuni controlli positivi sono necessari durante lo sviluppo del metodo e per il CQ: controllo a bassa positività, cellule infette, campioni di pazienti, surrogati prodotti mediante aggiunta del bersaglio. I controlli in bianco sono costituiti da acqua, tampone o altro fluido privo di DNasi/RNasi. Il materiale di controllo negativo deve contenere acidi nucleici non bersaglio noti piuttosto che solo acqua o tampone privi di DNasi/RNasi. In molti laboratori clinici, la percentuale di risultati positivi viene analizzata su base mensile e confrontata con una media di positivi stabilita per i dati storici.

Anche CLSI MM07 (Metodi di ibridazione in situ a fluorescenza), pubblicato nel 2013, è confermato fino al giugno 2023, ma viene mantenuto nel catalogo CLSI.³³ Per FISH, il controllo esterno è di solito un vetrino di riferimento. Ai fini del controllo qualità, le caratteristiche della

²⁹ CLSI MM01. Molecular Testing for Heritable Genetics and Specimen Identification, 4th Edition. Published in 2023

³⁰ CLSI. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods. 2nd ed. CLSI guideline MM13. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

³¹ CLSI. Molecular Diagnostic Methods for Solid Tumors (Nonhematological Neoplasms). 1st ed. CLSI guideline MM23. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

³² CLSI. Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases. 3rd ed. CLSI report MM03. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

³³ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Fluorescence In Situ Hybridization Methods for Clinical Laboratories; Draft Guideline—Second Edition CLSI document MM07 (Draft 2) (ISBN 1-56238-000-0). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2013

sonda possono essere valutate su 25 cellule mitotiche (50 se il bersaglio risiede su un cromosoma sessuale e vengono studiate cellule maschili) o 200 nuclei in interfase. Come per la validazione dell'esame, il risultato del controllo è espresso come frequenza di cellule con un segnale anormale.

CLSI MM09 contiene i requisiti degli esami genetici e genomici sull'uomo con metodi di sequenziamento dell'acido nucleico tradizionali e ad alto rendimento, pubblicato nel 2023 (Figura 1).³⁴

Il CQ dell'esame si applica al processo di esame NGS, che inizia con l'estrazione dell'acido nucleico e termina con l'elaborazione e l'analisi bioinformatica dei dati per generare i risultati (comprese le analisi primarie e secondarie). Le metriche predefinite del CQ, stabilite durante l'ottimizzazione e la convalida del test, vengono monitorate in più fasi del processo di misura (Figura 3 di MM09) (cioè durante la preparazione delle librerie, dopo il sequenziamento degli acidi nucleici e durante e dopo l'elaborazione e l'analisi dei dati bioinformatici). Sebbene non sia possibile definire una serie di criteri universalmente applicabili, MM09 fornisce un elenco esemplificativo.

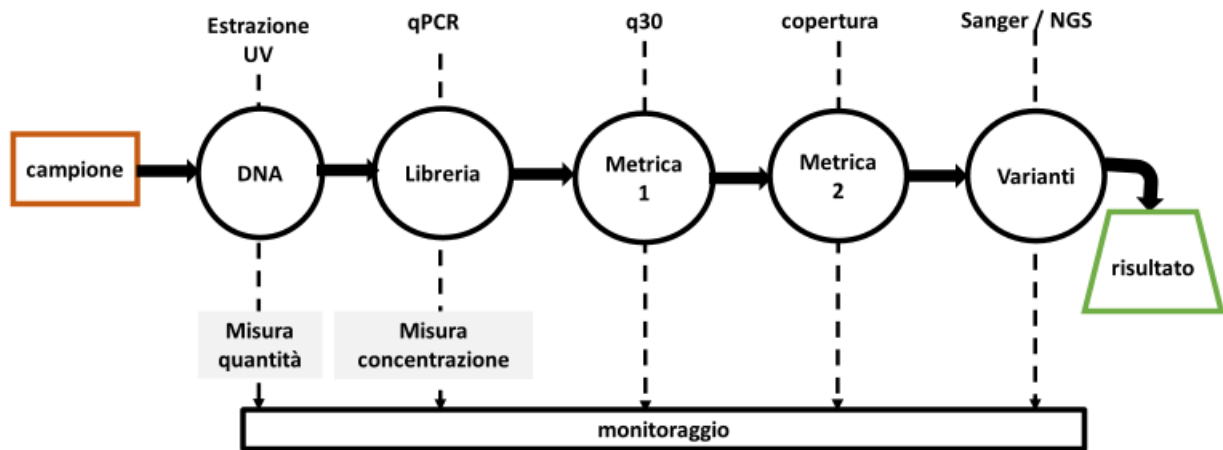
La Figura 3 di MM09 riassume il concetto del monitoraggio della qualità. Le metriche del CQ, una per fase in questo esempio, devono essere registrate per ogni campione e analizzate ogni mese per monitorare e identificare le variazioni delle prestazioni. Come minimo, ogni esame deve includere un controllo positivo e un controllo di contaminazione. Il laboratorio deve considerare di includere un controllo positivo vicino al LoD del test. Il controllo positivo deve rappresentare adeguatamente i tipi di varianti, comprese quelle comuni e quelle difficili da rilevare. In alternativa, è possibile utilizzare campioni di DNA (possibilmente da un tipo di campione diverso), campioni non provenienti da pazienti (ad esempio, linee cellulari) o campioni di riferimento alternativi (ad esempio, materiali di riferimento sintetici o pool di controlli positivi). Il laboratorio deve provare che le prestazioni dei campioni fittizi sono simili a quelle dei campioni clinici. Altri dettagli sul tema specifico sono disponibili nel documento ISO 20397-2:2021 e in letteratura.^{35,36}

³⁴ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Human Genetic and Genomic Testing Using Traditional and High Throughput Nucleic Acid Sequencing Methods. 3rd ed. CLSI guideline MM09 (ISBN 978-1-68440-174-1 [Print]; ISBN 978-1-68440-175-8 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2023

³⁵ UNI ISO 20397-2:2022. Biotecnologie - Sequenziamento massivo parallelo - Parte 2: Valutazione della qualità dei dati di sequenziamento

³⁶ Pradella M. Qualità dei metodi di sequenziamento massivo parallelo/sequenziamento di nuova generazione (MPS/NGS). La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio 2023 Giugno;19(2):138-44. DOI: 10.23736/S1825-859X.23.00190-1

Figura 1. scheda del controllo interno di qualità per esami genetici e genomici sull'uomo con metodi di sequenziamento dell'acido nucleico (ridisegnato dalle figure 2 e 3 di CLSI MM09)



CLSI MM22, recentemente aggiornato, tratta degli esami a micromatrice (Microarray) per la diagnosi e il monitoraggio delle malattie infettive.³⁷ La nuova edizione comprende l'aggiornamento delle piattaforme per includere le nuove tecnologie, l'aggiunta di un sottocapitolo per il piano di controllo della qualità individualizzato, la riorganizzazione dei contenuti in modo che corrispondano al percorso del flusso di lavoro, l'aggiunta di un diagramma di flusso del processo.

MM22 si occupa di analisi e interpretazione dei dati, determinazione del valore di soglia, verifica e validazione delle prestazioni, validazione clinica, controllo e garanzia della qualità, indicatori di qualità, controllo della qualità individualizzato, controllo della contaminazione.

MM22 prevede controlli esogeni o endogeni. Idealmente, il controllo interno appropriato ha un livello vicino al LoD. La presenza di un adeguato acido nucleico bersaglio e l'incorporazione del colorante fluorescente possono essere valutati utilizzando parametri spettrofotometrici come l'assorbanza a 260 e 280 nm e della fluorescenza alla lunghezza d'onda appropriata. La distribuzione dimensionale dei prodotti amplificati può essere valutata mediante elettroforesi su gel o metodi su colonna. Altri metodi di CQ dell'amplificazione, come la PCR o la PCR quantitativa per bersagli specifici, possono essere utilizzati. Per l'ibridazione, la qualità di una micromatrice è solitamente valutata in base a fattori quali lavaggio irregolare del vetrino, sfondo non uniforme, difetti di fabbricazione, fondo elevato, saturazione del segnale in primo piano, polvere, contaminazione, fattore di scala della normalizzazione. L'analisi d'immagine viene utilizzata per identificare le celle della griglia. L'inclusione di sonde di controllo positive e negative sulla

³⁷ CLSI. Microarrays for Diagnosis and Monitoring of Infectious Diseases. 2nd edition. CLSI guideline MM22. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2024.

superficie della micromatrice può essere utile.

A causa della complessità e della diversità della tecnologia micromatrice, il tentativo di determinare una politica unica di controllo di qualità per tutti sarebbe infruttuoso. Tuttavia, esistono linee guida standard che possono essere applicate con successo ai microarray da utilizzare per la diagnostica clinica. La Tabella 4 di MM22 elenca alcune aziende e istituzioni da cui è possibile ottenere i reagenti per il controllo qualità. Le micromatrici PCR sono disponibili in formato "aperto" e "chiuso". Le piattaforme erano inizialmente in formato aperto, consentendo all'utente finale di scegliere gli oligonucleotidi di cattura e le sonde. Un numero crescente di micromatrici è in formato chiuso, il che significa che il produttore fornisce una serie di controlli e l'interpretazione dei dati. Queste piattaforme chiuse stanno diventando sempre più numerose, per avere sistemi facili da usare che abbiano anche l'autorizzazione o la registrazione a livello normativo. In questi sistemi, l'utente finale non può modificare le micromatrici per includere controlli personalizzati. I controlli interni o di processo sono inclusi nel sistema e l'utente finale potrebbe non avere accesso all'analisi dei dati. I controlli interni del processo dimostrano che una o più fasi (ad esempio, la preparazione del campione, la trascrizione inversa dell'RNA in cDNA e l'amplificazione PCR del bersaglio) funzionano in modo soddisfacente, comprese le prestazioni complessive del sistema. Tuttavia, non dimostra che i componenti specifici. L'uso di controlli positivi e negativi specifici è necessario per dimostrare il funzionamento soddisfacente di ciascun componente. Ad esempio, possono essere esaminati almeno in ogni seduta due materiali di controllo, compreso uno in grado di rilevare errori nel processo di estrazione, due controlli per ogni amplificazione molecolare, un materiale di controllo in grado di rilevare l'inibizione (come descritto in CLSI MM03). Per le matrici PCR sia in formato aperto che chiuso, i laboratori medici devono usare controlli positivi e negativi. I campioni a questo scopo possono derivare da campioni clinici (cioè identificati con un metodo di analisi diverso) o da campioni artificiali che contengono ciascuno dei patogeni o delle sequenze bersaglio. Alcuni patogeni non sono disponibili in commercio. In questi casi, campioni clinici ben caratterizzati possono servire come utili surrogati (vedi documento CLSI MM17). Nei sistemi multicanale, il materiale da materiale clinico o da coltura può servire sia come controllo positivo sia come controllo negativo. I metodi che rilevano due diverse sequenze nucleotidiche all'interno di un organismo non possono essere controllati con un pannello di organismi che contengono entrambe le sequenze. Per questo motivo, i produttori possono raccomandare combinazioni di organismi, ma i laboratori medici devono conoscere i dettagli del metodo per evitare di esaminare combinazioni di organismi inadatte.

I controlli negativi includono acqua priva di DNA polimerasi e RNA polimerasi. Si consiglia di utilizzare più controlli negativi e di intervallarli durante la sequenza (ad esempio, prima, metà e ultima posizione). I controlli positivi o i campioni positivi noti contenenti le sequenze bersaglio (controlli positivi esterni) devono essere inclusi in ogni seduta, preparati, estratti e trattati nello stesso modo dei campioni dei pazienti. I risultati dei controlli esterni devono essere esaminati prima dei risultati dei campioni dei pazienti. In alcune micromatrici possono essere utilizzate sonde specifiche per determinate sequenze nucleotidiche con controlli interni (positivi). Il controllo interno viene aggiunto a ciascun campione clinico prima dell'estrazione degli acidi nucleici. La mancata generazione di risultati positivi per il controllo interno indica un fallimento nella fase di estrazione e/o nella fase di amplificazione e potrebbe indicare la presenza di inibitori

dell'amplificazione.

Nel controllo di qualità individualizzato, i dati dell'analisi dei rischi devono supportare il razionale per il numero, il tipo e la frequenza dei controlli, includendo, come minimo, dati che supportino l'uso dell'intervallo massimo tra le serie di controlli esterni. Il Piano del controllo di qualità deve avere numero, tipo e frequenza dei controlli e i criteri per le prestazioni accettabili, controllo esterno con ogni nuovo lotto e spedizione di reagenti.

Gli eventi di contaminazione possono essere rilevati in vari modi. I risultati negativi con reagenti standard e un bianco paziente. Può essere necessario amplificare e sequenziare una porzione del sospetto contaminante, così una sequenza identica tra diversi campioni di pazienti solleva il sospetto di contaminazione. Con un sistema sigillato, è possibile ridurre al minimo la contaminazione. Tuttavia, è necessario un monitoraggio per assicurarsi che questi sistemi siano davvero sigillati senza che l'amplicone fuoriesca, come controlli ambientali o controlli di pulizia ("wipe test").

Si deve osservare che termini come "controlli interni" e "controlli esterni" introducono rischi di ambiguità sia con i programmi di VEQ che con le prassi di CQI in generale. Sarebbe preferibile adottare espressioni specifiche, come ad esempio "controlli inclusi" e "controlli non inclusi" o "aggiunti".

CLSI MM20 tratta la qualità per gli esami genetici molecolari. Pubblicato nel 2012, valido tecnicamente fino a giugno 2023, non viene più revisionato, ma rimane nel catalogo CLSI.³⁸ Prevede controlli basati sull'origine (Controlli genomici: contengono le sequenze del genoma umano; Controlli sintetici: spesso comprendono sequenze oligonucleotidiche o segmenti subclonati di sequenze di acido nucleico), controlli basati su sequenze/varianti rappresentate (Positivo: nella maggior parte dei casi i campioni di controllo che contengono la(e) mutazione(i), variante(i) o(i) bersaglio(i) di acido nucleico per la procedura di esame; negativi: contengono le sequenze normali o "selvaggi (wild-type)"; controlli senza sagoma: contengono tutti i componenti di una procedura di amplificazione dell'acido nucleico da amplificare), basati su processi di misura (estrazione; amplificazione; ibridazione; controlli endogeni; controlli RNA esterni; controlli interni; controlli di rilevamento). I controlli positivi devono avere una concentrazione entro un intervallo da basso a medio. L'uso di un forte positivo è un rischio non necessario in quanto può costituire un possibile serbatoio di contaminazione. Periodicamente è necessario eseguire un controllo positivo vicino al LoD per confermare il LoD. In genere, i controlli positivi e negativi devono essere analizzati ogni volta che si analizzano i campioni dei pazienti. I risultati del QC saranno registrati e analizzati (ad esempio, grafici per identificare, tendenze, confronto dei risultati del QC con colleghi, uso di statistiche come deviazione standard e coefficiente di variazione quando appropriato, strumenti tradizionali come le regole di Westgard). Nel caso dei risultati qualitativi, il laboratorio registra un segnale numerico specifico. Ad esempio, uno spostamento nel rapporto genotipico calcolato dal programma informatico del metodo potrebbe indicare che il nuovo lotto di reagente è diverso e potrebbe causare futuri guasti.

³⁸ CLSI. Quality Management for Molecular Genetic Testing; Approved Guideline. CLSI document MM20-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012

L'andamento dei dati della popolazione di pazienti per rilevare cambiamenti improvvisi ed esiti clinici incongrui nei tassi di positività (presenza di una mutazione) può indicare problemi e anche rivelare problemi con le prestazioni degli esami.

CLSIMM24 si occupa dei metodi molecolari per la genotipizzazione e la tipizzazione dei ceppi di organismi infettivi. Pubblicato nel 2021, sostituisce MM10 e MM11.³⁹

Pur non essendo indirizzato alla diagnostica, è interessante per i laboratori medici nel punto che si occupa di ripetibilità (precisione nella serie) e riproducibilità (precisione tra le serie). Prevede di includere repliche (da cinque a dieci) a tre diverse concentrazioni (alta, media e bassa) e/o con modelli varianti rappresentativi della popolazione di pazienti, oltre a campioni negativi o selvaggi (wild-type) esaminati insieme. Le repliche a bassa concentrazione dovrebbero essere comprese tra due e quattro volte LLoD. Per la tipizzazione microbica basata su NGS, la ripetibilità può essere valutata sequenziando più librerie (almeno tre secondo le linee guida del Wadsworth Center⁴⁰) preparate dallo stesso acido nucleico estratto, seguito dalla valutazione della concordanza tra ciascuna replica. La riproducibilità può essere valutata mediante analisi di concordanza dei dati di sequenziamento della stessa libreria su più corse di sequenziamento (almeno tre secondo le linee guida del Wadsworth Center) in giorni diversi.

Una ulteriore fonte di informazioni sulla qualità degli esami su acidi nucleici è il documento ISO 17822.^{41, 42} ISO nota che In tutto il mondo il controllo di qualità nei laboratori medici spesso non viene eseguito correttamente. I costi della qualità rappresentano il 22% dei costi diretti del laboratorio. ISO 17822 prescrive l'uso di materiali di controllo e ne descrive i diversi tipi. Il laboratorio deve decidere il tipo e la frequenza appropriati di utilizzo dei controlli interni ed esterni, i cui risultati devono rimanere entro i limiti prestabiliti.

ISO 15189 include oggi i requisiti degli esami POCT prima fissati da ISO 22870.

Una ulteriore difficoltà: diversamente da altre clausole della norma, 7.3.7.2 non menziona gli esami POCT, anche se non li esclude. Tuttavia, sono disponibili altre fonti sulla materia.

³⁹ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Molecular Methods for Genotyping and Strain Typing of Infectious Organisms. 1st ed. CLSI guideline MM24 (ISBN 978-1-68440-126-0 [Print]; ISBN 978-1-68440-127-7 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2021

⁴⁰ Validation of next generation sequencing (NGS)-based methods for identification and/or characterization of infectious agents (isolates only). New York State Department of Health; 2016. Accessed 21 July 2021. <https://www.wadsworth.org/sites/default/files/WebDoc/ID%20WGS%20NGS%20Molecular%20Guidelines%20for%20Isolates.pdf>

⁴¹ UNI ISO 17822:2023. Sistemi di test diagnostici in vitro - Procedure di esame basate sull'amplificazione degli acidi nucleici - Guida pratica per la qualità nei laboratori

⁴² Pradella M. ISO 17822, la qualità per esami con amplificazione di acidi nucleici. La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio 2020 Marzo;16(1):4-6 DOI: 10.23736/S1825-859X.19.00023-9

NOTA su controlli per esami POCT.

CLSI POCT07 tratta degli approcci alla riduzione degli errori al punto di cura. Pubblicato nel 2010, confermato nel 2018, sta per essere revisionato.⁴³ POCT07 cita molte volte i controlli di qualità, senza entrare in dettagli. Ad esempio, nelle definizioni si afferma che il controllo di qualità comprende la misura dei materiali di controllo, la creazione di grafici dei risultati e la loro analisi per identificare le fonti di errore, nonché la valutazione e la documentazione di qualsiasi azione correttiva intrapresa a seguito di questa analisi, e si menzionano i controlli liquidi. Il monitoraggio dei risultati è menzionato più volte nelle Appendici.

CLSI POCT08 contiene pratiche di qualità negli esami non strumentali al punto di cura. Pubblicato nel 2010, confermato nel 2017, sta anche questo per essere revisionato.⁴⁴ Si tratta di strisce reattive per l'urina, esami per il sangue occulto nelle feci ed esami rapidi per l'influenza a lettura visuale. Prevede controlli interni, che valutano se alcune parti del dispositivo funzionano correttamente, per verificare che il sistema funzioni come previsto, che sia stato aggiunto un campione sufficiente e, per i metodi a flusso laterale, se il campione è migrato correttamente attraverso la striscia reattiva. Invece i controlli esterni imitano i campioni dei pazienti e monitorano il processo di esame, dall'applicazione del campione all'interpretazione dei risultati. Di solito si tratta di un risultato quantitativo (normale o anormale) o di un risultato qualitativo (positivo o negativo). POCT08 non descrive prassi di monitoraggio dei risultati dei controlli, ma in diversi punti sembra limitare l'uso dei controlli come prove "passa/non passa".

Si deve notare che le espressioni "controllo interno" e "controllo esterno" introducono fattori di ambiguità con CQI e VEQ. Meglio sarebbe utilizzare l'espressione "incorporati", come nel documento OMS.⁴⁵

CLSI POCT14 concerne esami della coagulazione al punto di cura, pubblicato nel 2020.⁴⁶ POCT14 descrive sistemi di controllo interni (cioè "a bordo"), che verificano l'integrità operativa

⁴³ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Quality Management: Approaches to Reducing Errors at the Point of Care; Approved Guideline. CLSI document POCT07-A (ISBN 1-56238-734-0). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2010

⁴⁴ CLSI. Quality Practices in Noninstrumented Point-of-Care Testing: An Instructional Manual and Resources for Health Care Workers; Approved Guideline. CLSI document POCT08-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.

⁴⁵ Laboratory Quality Management System. Chap. 8. Process control— quality control for qualitative and semiquantitative procedures. 1 January 2011.
<https://extranet.who.int/lqsi/sites/default/files/attachedfiles/LQMS%206%207%208%20Quality%20Control.pdf>

⁴⁶ CLSI. Point-of-Care Coagulation Testing and Anticoagulation Monitoring. 2nd ed. CLSI guideline POCT14. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020



Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio

Componente della *World Association of Societies of Pathology
and Laboratory Medicine* www.sipmel.it

Certificazione ISO



Commissione Nazionale Qualità ed Accredimento
Gruppo di Studio Informatica *Coordinatore: Marco Pradella*
Gruppo di Studio sul Management sanitario
Coordinatore: Giovanni Casiraghi

documento Q19
validità risultati
*Approvato dal Consiglio Nazionale
del 27/2/2024 - Versione 1.0*

dello strumento, e soluzioni QC o cartucce elettroniche. Le registrazioni del QC dovrebbero essere riviste periodicamente, ma CLSI non entra in dettagli. Viene costantemente fatto riferimento alle istruzioni del fabbricante, come già faceva il documento ISO 15198. L'instabilità estrema dei campioni rende difficile la stima della precisione del metodo. In definitiva, l'eterogeneità e la particolarità dei dispositivi POCT costringono a non poter prescindere dalle istruzioni specifiche del fabbricante, utilizzando il più possibile procedure analoghe agli altri esami di laboratorio.

ISO 15189 prende in considerazione in diversi punti i metodi con risultati qualitativi: 3.8 esame, 3.29 esattezza, 6.5 taratura, 6.5.3 tracciabilità, 7.3.4 incertezza. Non fornisce indicazioni nel punto 7.3.7 per il monitoraggio dei risultati di questi esami, ma i laboratori hanno a disposizione molte altre fonti.

NOTA su risultati qualitativi.

WHO fornisce buone indicazioni per i risultati qualitativi.⁴⁷ Gli esami qualitativi sono quelli che misurano la presenza o l'assenza di una sostanza o valutano caratteristiche cellulari come la morfologia. I risultati non sono espressi in termini numerici, ma in termini descrittivi o qualitativi come "positivo", "negativo", "reattivo", "non reattivo", "normale" o "anormale". I controlli positivi e negativi devono essere utilizzati per monitorare l'efficacia delle procedure di esame che utilizzano colorazioni o reagenti speciali e misure con punti finali quali agglutinazione, cambiamento di colore o altri risultati non numerici.

La maggior parte dei controlli incorporati (quelli che ISO spesso chiama "interni") monitora solo una parte della fase di esame e varia da un esame all'altro per quanto riguarda il monitoraggio. OMS consiglia quindi l'esame periodico dei materiali di controllo tradizionali che imitano i campioni dei pazienti.

Questi materiali di controllo vanno usati nello stesso modo in cui si esaminano i campioni dei pazienti, almeno un controllo positivo e uno negativo, preferibilmente una volta al giorno o come minimo con la frequenza raccomandata dal produttore. I controlli positivi devono essere vicini al valore soglia dell'esame. Per le procedure di agglutinazione, servono un controllo positivo debole accanto a un controllo negativo e un controllo positivo più forte. Per gli esami con una fase di estrazione, come alcuni rapidi per lo Streptococco di gruppo A, i controlli devono poter rilevare errori nel processo di estrazione.

Il controllo qualità in microbiologia richiede l'uso di organismi di controllo vivi con reazioni prevedibili per verificare che i coloranti, i reagenti e i terreni di coltura funzionino correttamente. Per ogni reazione, devono essere provati organismi con risultati sia positivi che negativi. Alcune organizzazioni offrono ceppi di riferimento, disponibili presso i distributori locali: American Type Culture Collection (ATCC), National Type Culture Collection (NTCC, Regno Unito), Pasteur Institute Collection (CIP, Francia).

Data la loro importanza, i coloranti devono essere controllati quotidianamente con materiali CQ positivi e negativi. Nella maggior parte dei casi, i controlli positivi e negativi devono essere colorati con ogni lotto di vetrini dei pazienti.

Tutti i risultati dei CQ devono essere registrati ogni volta che vengono eseguiti. WHO non fornisce indicazioni sulle modalità per raccogliere e presentare i risultati di CQ per esami qualitativi o sulle statistiche da utilizzare. Molti dei controlli proposti vengono utilizzati nella modalità "passa/non passa", quindi non forniscono informazioni sulla precisione del metodo.

Se non è disponibile materiale adeguato al CQI, per ISO 15189 il laboratorio deve prendere in

⁴⁷ Laboratory Quality Management System. Chap. 8. Process control— quality control for qualitative and semiquantitative procedures. 1 January 2011.
<https://extranet.who.int/lqsi/sites/default/files/attachedfiles/LQMS%206%207%208%20Quality%20Control.pdf>

considerazione l'uso di altri metodi. Per esempio, l'analisi dell'andamento dei risultati dei pazienti, ad esempio con una media mobile dei risultati dei pazienti o una percentuale di campioni con risultati inferiori o superiori a determinati valori o associati a una diagnosi. Oppure il confronto dei risultati dei campioni dei pazienti con i risultati da una procedura alternativa validata in modo che la sua taratura sia metrologicamente riconducibile a riferimenti dello stesso ordine o di ordine superiore, come specificato nella norma ISO 17511.^{48,49} O ancora la ripetizione dell'esame dei campioni conservati di pazienti.

NOTA su confronto di metodi.

La procedura di confronto qui suggerita da ISO 15189 è differente da quella descritta al successivo punto 7.3.7.4. Si devono infatti considerare le definizioni fissate nel Vocabolario Internazionale di Metrologia: [VIM3: 2.46] ..., comparabilità metrologica ... i risultati sono metrologicamente riconducibili allo stesso riferimento; [VIM3: 2.47] ..., compatibilità metrologica ... il valore assoluto della differenza di una qualsiasi coppia di valori misurati da due diversi risultati di misura sia minore di un multiplo scelto dell'incertezza standard di tale differenza.⁵⁰

NOTA su alternative al CQI con controlli.

In ossequio alle direttive ISO, la norma enuncia una serie di alternative alla procedura del CQI con materiali di controllo, senza però specificarne dettagli e riferimenti.

⁴⁸ UNI EN ISO 17511:2021. Dispositivi medico-diagnostici in vitro - Requisiti per stabilire la tracciabilità metrologica dei valori assegnati ai calibratori, ai materiali di controllo della correttezza e campioni umani

⁴⁹ Pradella M. Taratura, armonizzazione e standardizzazione nelle nuove ISO 17511 e ISO 2115La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio 2020 Giugno;16(2):129-31. DOI: 10.23736/S1825-859X.19.00034-3

⁵⁰ ISO/IEC Guide 99:2007. International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM)

NOTA su CQI con media mobile.

Tra le alternative al CQI con materiali di CQ, ISO 15189 indica quella della media mobile dei risultati dei campioni di pazienti (MM). Tuttavia, non riporta riferimenti guida né indicazioni di dettaglio.

Va evidenziato che i metodi documentati si riferiscono a medie mobili di risultati di pazienti, non di materiali di CQ, erroneamente proposte da alcuni programmi informatici per il CQ. È disponibile sul tema una certa letteratura scientifica.^{51, 52, 53, 54} La realizzazione della MM può richiedere un notevole impegno di lavoro. Il vantaggio principale del CQ con MM è che è continuo e quindi offre la possibilità di rilevare immediatamente (o almeno più rapidamente) i problemi dell'esame, soprattutto negli intervalli tra le misurazioni CQI con i materiali. Il processo di attuazione del CQ con MM in un laboratorio richiede un'attenta messa a punto e l'ottimizzazione delle impostazioni degli allarmi.

NOTA su CQI con ripetizione di esami.

In ambito veterinario ha riscosso un certo successo la procedura di CQ con la ripetizione di esami su campioni di pazienti (RPT-CQ).⁵⁵ Con questa procedura il risultato del controllo è la differenza tra misure ripetute, su cui possono essere applicate le stesse regole del CQ statistico, a partire per esempio da 1-3s.⁵⁶

- ⁵¹ van Anandel, Esther, Henricks, Linda M., Giliams, Alex P.M., Noordervliet, Richard M., Mensink, Willemina J., Filippo, Dionne, van Rossum, Huub H., Cobbaert, Christa M., Gillis, Judith M.E.P., Schenk, Paul W. and den Elzen, Wendy P.J.. "Moving average quality control of routine chemistry and hematology parameters – a toolbox for implementation" *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, vol. 60, no. 11, 2022, pp. 1719-1728. <https://doi.org/10.1515/cclm-2022-0655>
- ⁵² van Rossum, Huub H. and van den Broek, Daan. "Design and implementation of quality control plans that integrate moving average and internal quality control: incorporating the best of both worlds" *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, vol. 57, no. 9, 2019, pp. 1329-1338. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0027>
- ⁵³ Huub H. van Rossum (2022) Technical quality assurance and quality control for medical laboratories: a review and proposal of a new concept to obtain integrated and validated QA/QC plans, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 59:8, 586-600, DOI: 10.1080/10408363.2022.2088685
- ⁵⁴ Cembrowski GS. Use of patient data for quality control. *Clin Lab Med*. 1986;6(4):715–733.
- ⁵⁵ Flatland B, Freeman KP. Repeat patient testing quality control (RPT-QC): Background and theory. *Vet Clin Pathol*. Published online July 19, 2023. doi:10.1111/vcp.13289
- ⁵⁶ Westgard JO. Basic QC Practices. Fourth Edition. Training in Statistical Quality Control for Medical Laboratories. 2016. Westgard QC • 7614 Gray Fox Trail • Madison, Wisconsin 53717.



Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio

Componente della *World Association of Societies of Pathology
and Laboratory Medicine* www.sipmel.it

Commissione Nazionale Qualità ed Accredimento
Gruppo di Studio Informatica *Coordinatore: Marco Pradella*
Gruppo di Studio sul Management sanitario
Coordinatore: Giovanni Casiraghi

Certificazione ISO



documento Q19
validità risultati
*Approvato dal Consiglio Nazionale
del 27/2/2024 - Versione 1.0*

Frequenza e procedure per il CQI

Per UNI EN ISO 15189:2023 il CQI deve essere eseguito con una frequenza basata sulla stabilità e sulla solidità del metodo di esame e sul rischio di danni al paziente derivanti da un risultato errato (7.3.7.2, lettera d). I dati risultanti devono essere registrati in modo tale da poter individuare tendenze e variazioni e, se del caso, devono essere applicate tecniche statistiche per esaminare i risultati (lettera e). I dati del CQI devono essere rivisti a intervalli regolari, con criteri di accettabilità definiti e in un arco di tempo che consenta una valutazione significativa delle prestazioni attuali (lettera f).

NOTA su regole e frequenza dei controlli.

La norma ISO enuncia i principi su frequenza e statistiche, ma non fa seguito con indicazioni puntuali. Per la maggior parte degli schemi di controllo di qualità, basati su risultati numerici quantitativi, è disponibile il documento CLSI C24.⁵⁷

Un primo criterio per scegliere regole e frequenza è costituito dalla metrica Sigma, essenzialmente il quoziente tra variabilità accettabile e imprecisione della misura.⁵⁸

La frequenza dei controlli è diversa per lo schema operativo dei lotti (ad esempio, una micropiastra o una sequenza predefinita di campioni) rispetto a quello in modalità continua, (intervallo di un gruppo di campioni, in base al tempo o al numero).

CLSI C24 descrive anche le modalità per eseguire la valutazione del programma di CQI richiesta dalla norma ISO.

Per UNI EN ISO 15189:2023 Il laboratorio deve impedire il rilascio dei risultati dei pazienti nel caso in cui il CQ non rispetti i criteri di accettabilità definiti. Quando i criteri di accettabilità definiti per il CQ non sono soddisfatti e indicano che i risultati possono contenere errori clinicamente significativi, i risultati devono essere rifiutati e i campioni dei pazienti pertinenti devono essere riesaminati dopo la correzione dello scostamento. Inoltre, vanno rivisti i risultati di campioni di pazienti esaminati dopo l'ultimo evento CQ riuscito.

NOTA su CQI e rilascio dei risultati.

ISO si limita a prescrivere di “impedire il rilascio dei risultati”, senza dettagli operativi. Nella pratica dei laboratori medici, ciò si realizza con le modalità considerate da ISO al punto 7.4.1.5 “Selezione, revisione, rilascio e presentazione dei risultati in modo automatizzato”. Tuttavia, abbiamo visto come molti controlli di qualità (sia “incorporati” che non) siano concepiti come prova “passa/non passa”.

⁵⁷ CLSI. Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions. 4th ed. CLSI guideline C24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016

⁵⁸ Westgard JO. Six Sigma Quality Design & Control: Desirable Precision and Requisite QC for Laboratory Measurement Processes. 2nd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2006.

Commento generale ai requisiti del CQI secondo ISO 15189

Dopo la pubblicazione di ISO 20914⁵⁹ il controllo di qualità interno assume una valenza che va oltre il monitoraggio dei risultati degli esami, ma diventa base per la stima dell'incertezza di misura.⁶⁰ Dove, a differenza di ISO 17025, l'incertezza strumentale della misura viene scorporata da quella dei processi preesistenti e dei processi postesistenti.

Nella nuova versione di ISO 15189 il CQI viene così caratterizzato da tre pilastri: il monitoraggio, il rilascio dei risultati, l'incertezza di misura. Non tutte le pratiche conosciute di CQI sono conformi a tutti e tre i pilastri. Molte attività con l'etichetta CQI non hanno valenza di monitoraggio e quindi di stima dell'incertezza, ma si limitano alla selezione preventiva dei risultati. Queste si avvicinano più alle misure preventive della qualità, come la taratura, allontanandosi dal monitoraggio. Ad esempio, l'uso dei ceppi standard in microbiologia per le prove colturali. Per queste attività, il termine "controllo di qualità" introduce un'ambiguità non positiva.

Gli esami con risultati numerici quantitativi e quelli che ricavano un risultato nominale qualitativo dal confronto con una soglia vengono descritti in ISO 15189 (punto 7.3.4 lettera f e lettera g) e ISO 20914, ai fini della stima di incertezza.

Tuttavia, ISO 15189 non trascura affatto i risultati nominali qualitativi. Al punto 3.8 (nota 2) affianca alla pari le due tipologie di esami, qualitativi e quantitativi. Al punto 3.29 (nota 4) riconosce che "Per gli esami qualitativi, l'esattezza della misurazione (vicinanza di accordo) può essere espressa in termini di concordanza (cioè corrispondenza percentuale con un esame di riferimento)." In inglese, "trueness", "closeness of agreement", "concordance", "agreement". Al punto 6.5.1 si chiede per i metodi qualitativi I "requisiti necessari per la riproducibilità nel tempo", anche se non fosse determinabile la tracciabilità ad un riferimento, citando come esempi i gruppi sanguigni. D'altra parte, al punto 6.5.3 lettera e) "Per i metodi qualitativi, la tracciabilità può essere dimostrata mediante analisi di materiale noto o campioni precedenti sufficienti a dimostrare un'identificazione coerente e, se applicabile, l'intensità della reazione".

Si deve concludere che, in linea di principio, nessun tipo di esame può sottrarsi alla necessità di stimare in qualche modo l'incertezza dei risultati, a partire dalle forme canoniche di precisione. Le norme stanno man mano registrando l'evoluzione delle conoscenze scientifiche in materia, maturando di versione in versione. Tra queste recenti conoscenze, quelle documentate da EURACHEM⁶¹ e da ISO

⁵⁹ UNI ISO/TS 20914:2023. Laboratori medici - Guida pratica per la stima dell'incertezza di misura

⁶⁰ Pradella M. Alcune certezze dell'incertezza di misura: nuova ISO 20914 e raccomandazioni SIPMeL. La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio 2021 Settembre;17(3):200-8. DOI: 10.23736/S1825-859X.21.00112-2

⁶¹ R. Bettencourt da Silva, S.L.R. Ellison (Eds.), Eurachem/CITAC Guide: Assessment of performance and uncertainty in qualitative chemical analysis (first ed.), Eurachem (2021)



Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio

Componente della World Association of Societies of Pathology
and Laboratory Medicine www.sipmel.it

Certificazione ISO



Commissione Nazionale Qualità ed Accredimento
Gruppo di Studio Informatica *Coordinatore: Marco Pradella*
Gruppo di Studio sul Management sanitario
Coordinatore: Giovanni Casiraghi

documento Q19
validità risultati
Approvato dal Consiglio Nazionale
del 27/2/2024 - Versione 1.0

27877⁶² nonché ISO 16393⁶³, dove si introduce il concetto di “probabilità” dei risultati qualitativi.⁶⁴ I laboratori medici hanno bisogno di linee guida semplici, praticabili per elaborare i risultati puramente qualitativi, non derivanti da soglie, in termini di precisione e incertezza.^{65, 66}

Una ulteriore difficoltà: diversamente da altre clausole della norma, 7.3.7.2 non menziona gli esami POCT, anche se non li esclude. CLSI sembra dare per scontato il CQI nei servizi POCT, ma non fornisce dettagli operativi, salvo richiamare più volte il ruolo dei produttori dei dispositivi. Più volte sembra intendere la prova dei controlli come “passa/non passa”, rinunciando in questo modo alla funzione di monitoraggio e all’utilizzo per la stima di precisione e incertezza previsto da ISO 20914.

È discutibile se i materiali di controllo utilizzati solo nella modalità “passa/non passa” possano essere considerati una procedura di CQI, mancando totalmente della funzione di monitoraggio e operando una selezione “preventiva” dei risultati tale da avvicinarne le caratteristiche più ai materiali di aggiustamento della taratura, ovvero ai calibranti, che ai materiali di CQI. Probabilmente un perfezionamento della nomenclatura di questi materiali ne faciliterebbe la gestione ed eviterebbe fraintendimenti. Per esempio, l’espressione “verifica del metodo” invece di “controllo di qualità”. I materiali per la sorveglianza dei metodi, sia quantitativi che qualitativi, dovrebbero dare risultati vicini alla soglia decisionale e, in un certo senso, imprevedibili (come sono ad esempio i risultati delle VEQ), in modo da esplorare l’incertezza dei risultati che può influire sulle successive decisioni mediche.

Infine, in diversi tipi di metodi (dai vecchi RIA ai nuovi NGS) la sorveglianza della validità dei risultati si può avvalere di metriche diverse dalle tradizionali misure su materiali di controllo. Il laboratorio non dovrebbe nutrire pregiudizi su queste metriche, ma invece dovrebbe studiarne con cura l’applicazione per poterle utilizzare proficuamente.

⁶² UNI ISO/TR 27877:2021. Analisi statistica per valutare la precisione dei metodi di misurazione binari e i loro risultati

⁶³ ISO/TS 16393:2019. Molecular biomarker analysis — Determination of the performance characteristics of qualitative measurement methods and validation of methods.

⁶⁴ Pradella M. New Guides for Uncertainty of Qualitative Results, The Journal of Applied Laboratory Medicine, Volume 8, Issue 1, January 2023, Pages 217–218, <https://doi.org/10.1093/jalm/jfac087>

⁶⁵ Pradella M. Precision and uncertainty of results: examples of application of SIPMeL Recommendations. December 2021. 6° Congresso Nazionale SIPMeL. DOI: 10.13140/RG.2.2.22315.52006

⁶⁶ Pradella M. Easiness of Uncertainty Estimation and Use for Quantitative and Qualitative Results According to ISO. July 2022. 2022 AACC ANNUAL SCIENTIFIC MEETING. DOI: 10.13140/RG.2.2.27567.20647

Valutazione esterna della qualità (VEQ)

ISO 15189 al punto 7.3.7.3 include nel monitoraggio delle prestazioni dei metodi di esame il confronto con i risultati di altri laboratori, ovvero la partecipazione a programmi di VEQ adeguati agli esami e all'interpretazione dei risultati degli esami, compresi i metodi di esame POCT. Il laboratorio stabilisce una procedura per l'iscrizione, la partecipazione e valutazione dei risultati delle VEQ per i metodi d'esame utilizzati, quando disponibili. I campioni di VEQ devono essere trattati da personale che esegue abitualmente le procedure di preesame, esame e postesame. Il programma o i programmi di VEQ selezionati dal laboratorio devono controllare i processi di preesame, esame e postesame, fornire campioni che imitino i campioni dei pazienti per gli impegni clinicamente rilevanti e infine soddisfare i requisiti ISO/IEC 17043.

Il documento Accredia RT-35 aggiunge al punto 7.3.7.3 che il laboratorio deve pianificare la propria partecipazione a VEQ mediante approccio basato sul rischio, ovvero non in modo passivamente acritico. La partecipazione a VEQ può essere richiesta da ACCREDIA a Laboratori in corso di accreditamento o già accreditati, come elemento di valutazione per la concessione o il mantenimento dell'accREDITAMENTO.⁶⁷ Quando possibile, il laboratorio deve rivolgersi a fornitori VEQ accreditati in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17043. Il ricorso a fornitori VEQ non accreditati deve essere motivato.

NOTA su VEQ e rischio.

“Partecipazione a VEQ mediante approccio basato sul rischio” non viene chiarito nei documenti Accredia. Non dovrebbe essere interpretato come licenza di fare o meno qualche confronto tra laboratori. Come per la scelta del fornitore non accreditato ISO 17043, qualunque opzione deve essere motivata. ISO 15189 al punto 7.3.7.3 non descrive il confronto con altri laboratori come opzionale. Lascia però al laboratorio la possibilità di considerare non adeguate le offerte commerciali di VEQ, per rivolgersi quindi alle alternative della lettera f. Ad esempio, per un esame eseguito nel laboratorio solo di rado può essere eccessivo un programma di VEQ che preveda un esercizio al mese, più delle sedute previste nel laboratorio. In questo caso il laboratorio passerà alle alternative della lettera f.

Per ISO 15189, nella scelta dei programmi di VEQ, il laboratorio deve considerare il tipo di valore atteso offerto. I valori attesi possono essere fissati in modo indipendente da un metodo di riferimento, o ricavati da dati di consenso generale, ottenuti da dati di consenso di un gruppo di pari, o infine individuati da un gruppo di esperti. Quando non sono disponibili valori attesi indipendenti dal metodo, i valori di consenso possono essere utilizzati per determinare se le deviazioni sono specifiche del laboratorio o del metodo. Quando la mancanza di commutabilità dei materiali di VEQ può ostacolare il confronto tra alcuni metodi, può essere comunque utile effettuare confronti tra i metodi per i quali è commutabile, piuttosto che affidarsi solo a confronti interni al metodo.

UNI EN ISO 15189:2023 prevede che quando un programma di VEQ non è disponibile o non è

⁶⁷ Accredia RT-35 (PRESCRIZIONI PER L'ACCREDITAMENTO DEI LABORATORI MEDICI - UNI EN ISO 15189:2023, versione 02)



Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio

Componente della *World Association of Societies of Pathology
and Laboratory Medicine* www.sipmel.it

Commissione Nazionale Qualità ed Accreditamento
Gruppo di Studio Informatica *Coordinatore: Marco Pradella*
Gruppo di Studio sul Management sanitario
Coordinatore: Giovanni Casiraghi

Certificazione ISO



documento Q19
validità risultati

*Approvato dal Consiglio Nazionale
del 27/2/2024 - **Versione 1.0***

considerato adeguato, il laboratorio deve utilizzare metodologie alternative per monitorare le prestazioni del metodo d'esame. Il laboratorio deve giustificare le ragioni dell'alternativa scelta e fornire prove della sua efficacia. Le alternative accettabili comprendono la partecipazione a scambi di campioni con altri laboratori, il confronto tra laboratori dei risultati dell'esame di materiali CQI identici, misura di materiale calibratore con un numero di lotto diverso o del materiale di controllo dell'esattezza del produttore, misura di organismi microbiologici utilizzando prove su aliquote in cieco sullo stesso campione da parte di almeno due persone, o su almeno due analizzatori, o con almeno due metodi. Ma anche la misura di materiali di riferimento considerati commutabili con i campioni dei pazienti, la misura di campioni di pazienti provenienti da studi di correlazione clinica, infine la misura di materiali provenienti da depositi di cellule e tessuti.



Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio

Componente della *World Association of Societies of Pathology
and Laboratory Medicine* www.sipmel.it

Commissione Nazionale Qualità ed Accreditamento
Gruppo di Studio Informatica *Coordinatore: Marco Pradella*
Gruppo di Studio sul Management sanitario
Coordinatore: Giovanni Casiraghi

Certificazione ISO



documento Q19
validità risultati
*Approvato dal Consiglio Nazionale
del 27/2/2024 - Versione 1.0*

NOTA su alternative a VEQ.

Questo è uno dei punti in cui il testo di ISO15189:2023 si discosta dalle direttive originali ISO, estendendosi in prescrizioni di dettaglio invece di limitarsi alla enunciazione di principi. Non precisa peraltro se le prescrizioni sono rivolte al laboratorio o all'organizzatore di confronti VEQ. Mancano inoltre riferimenti a linee guida autorevoli che, in uno spazio ben più ampio del testo della norma, possono dare ai laboratori le modalità precise per partecipare ai programmi VEQ, come ad esempio CLSI QMS24⁶⁸ e CLSI MM14⁶⁹.

Una delle alternative proposte, la prova in cieco da due o più operatori, corrisponde alla proposta contenuta nel documento UK-SMI Q2 citata come CQI.⁷⁰

Anche l'esame di materiali provenienti da depositi di cellule e tessuti è una pratica descritta nel CQI come ripetizione di esami su campioni di pazienti (RPT-CQ)⁷¹ o come esame di Micromatrici tessutali standardizzate (TMA) come descritto da CLSI I/LA28 per esami immunoistochimici.⁷²

CLSI QMS24, confermato almeno fino al 2026, prevede più possibilità oltre quelle di ISO 15189. Sono infatti procedure di suddivisione del campione, esterne ma anche interne, ripetizione di campioni conservati ("audit sample"), esami di calibratori di lotto diverso, confronti tra laboratori del CQI, seconda interpretazione dei risultati, osservazione diretta dell'esame, correlazioni cliniche, microorganismi surrogati, programmi istituzionali simili a VEQ.

QMS24 prevede confronti anche per i risultati qualitativi. In particolare, l'Appendice D è dedicata alla valutazione statistica dei risultati qualitativi, dove si può utilizzare la statistica kappa.⁷³ La statistica kappa confronta l'accordo osservato con quello che ci si potrebbe aspettare per caso. I valori di kappa vanno da 1 (accordo completo) a 0 (nessun accordo al di là di quello atteso per caso) fino a -1 (disaccordo completo, che in laboratorio suggerisce un'inversione sistematica dei risultati, forse per un errore di trascrizione o di programmazione). I valori kappa superiori a 0,8 possono essere considerati un eccellente accordo, mentre quelli compresi tra 0,6 e 0,8 possono

⁶⁸ CLSI QMS24. Using Proficiency Testing and Alternative Assessment to Improve Medical Laboratory Quality, 3rd Edition. September 29, 2016.

⁶⁹ CLSI MM14. Design of Molecular Proficiency Testing/External Quality Assessment, 2nd Edition. May 23, 2013.

⁷⁰ UK Standards for Microbiology Investigations. Quality Guidance Q 2 Issue no: 8 Issue date: 23.07.21. Quality assurance in the diagnostic infection sciences laboratory

⁷¹ Flatland B, Freeman KP. Repeat patient testing quality control (RPT-QC): Background and theory. Vet Clin Pathol. Published online July 19, 2023. doi:10.1111/vcp.13289

⁷² Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document I/LA28-A2### (ISBN 1-56238-000-0###). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2009.

⁷³ Chmura Kraemer H, Periyakoil VS, Noda A. Kappa coefficients in medical research. Stat Med. 2002;21(14):2109-2129.



Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio

Componente della World Association of Societies of Pathology
and Laboratory Medicine www.sipmel.it

Commissione Nazionale Qualità ed Accredimento
Gruppo di Studio Informatica *Coordinatore: Marco Pradella*
Gruppo di Studio sul Management sanitario
Coordinatore: Giovanni Casiraghi

Certificazione ISO



documento Q19
validità risultati
*Approvato dal Consiglio Nazionale
del 27/2/2024 - Versione 1.0*

essere considerati un accordo ragionevole. Con 20 o più campioni, un valore kappa superiore a 0.5 è statisticamente significativo e indica che l'accordo non è interamente dovuto al caso.

CLSI QMS24 sembra un po' troppo determinato sulla significatività statistica di un kappa di 0.5 o appena superiore. Un approccio più prudente potrebbe avvalersi, in alternativa, dell'intervallo di confidenza della stessa statistica kappa. Possiamo peraltro notare che la statistica kappa si basa su misure ripetute; quindi, può essere un modello utile anche per la stima di precisione e incertezza.

NOTA su esami molecolari e VEQ

CLSI MM14⁷⁴ descrive i programmi di VEQ per esami molecolari.

Non potendo usare campioni dei pazienti, come il sangue intero, CLSI individua archivi di cellule e tessuti dove prendere per le VEQ linee cellulari, DNA genomico umano purificato, batteri, virus e DNA batterico e virale purificato. Tuttavia, per la maggior parte dei disordini rari, l'unica fonte di materiale sarà costituita dai campioni residui dei pazienti, de-identificati e scambiati con altri laboratori. Si conoscono anche materiali sintetici come campioni normali di pazienti, come urine o sangue intero, addizionati di un virus o di un batterio noto, DNA genomico purificato da una linea cellulare con mutazioni genetiche note, DNA o RNA virale purificato in tampone, DNA e RNA sintetici. Un altro esempio sono le matrici di carta da filtro tipicamente utilizzata per lo screening neonatale macchiate con sangue di adulti o adolescenti portatori di mutazioni di fibrosi cistica, da cui i laboratori partecipanti estraggono il DNA e cercano gli alleli della malattia.

La VEQ molecolare può descrivere la variabilità dei singoli passaggi del flusso di esame: estrazione del DNA, purificazione, sequenziamento, elettroforesi, quantificazione, interpretazione. Il primo passaggio quantitativo è l'estrazione dell'acido nucleico. Le evidenze sperimentali hanno dimostrato differenze significative nella capacità dei laboratori di estrarre e misurare il DNA.^{75,76} Variabilità sono state dimostrate, con diverse statistiche, anche per il sequenziamento⁷⁷ e naturalmente anche per i metodi PCR.⁷⁸

Si organizzano VEQ anche per risultati qualitativi. I programmi di VEQ molecolare di solito non dispongono di materiali di riferimento per determinare il risultato "corretto". Possono definire un risultato corretto come un consenso di tutti i partecipanti al test (ad esempio, dell'80%). I risultati dei partecipanti possono variare in base al metodo utilizzato per il test e, quando un numero sufficiente di partecipanti risponde, i risultati devono essere raggruppati in base al metodo. I programmi possono anche utilizzare laboratori di riferimento, laboratori con una buona reputazione nel programma, ad esempio, con punteggi positivi negli ultimi tre esercizi. CLSI descrive la rappresentazione dei risultati di un esercizio per la Fibrosi cistica, dove le risposte sono costituite da varianti come 7T/7T, 5T/7T, G542X/G543X, 9T/9T, e la sintesi è

⁷⁴ CLSI MM14. Design of Molecular Proficiency Testing/External Quality Assessment, 2nd Edition. May 23, 2013.

⁷⁵ Raggi CC, Pinzani P, Paradiso A, Pazzagli M, Orlando C. External quality assurance program for PCR amplification of genomic DNA: an Italian experience. Clin Chem. 2003;49(5):782-791.

⁷⁶ Brown J, Donev AN, Aslanidis C, et al. Observational study on variability between biobanks in the estimation of DNA concentration. BMC Res Notes. 2009;2:208.

⁷⁷ Patton SJ, Wallace AJ, Elles R. Benchmark for evaluating the quality of DNA sequencing: proposal from an international external quality assessment scheme. Clin Chem. 2006;52(4):728-736. doi:10.1373/clinchem.2005.061887

⁷⁸ Ramsden SC, Daly S, Geilenkeuser WJ, et al. EQUAL-quant: an international external quality assessment scheme for real-time PCR. Clin Chem. 2006;52(8):1584-1591. doi:10.1373/clinchem.2005.066019



Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio

Componente della *World Association of Societies of Pathology
and Laboratory Medicine* www.sipmel.it

Certificazione ISO



Commissione Nazionale Qualità ed Accredimento
Gruppo di Studio Informatica *Coordinatore: Marco Pradella*
Gruppo di Studio sul Management sanitario
Coordinatore: Giovanni Casiraghi

documento Q19
validità risultati
*Approvato dal Consiglio Nazionale
del 27/2/2024 - Versione 1.0*

espressa come percentuali di concordanza, da 94 a 100%. Come QMS24, MM14 applica ai risultati qualitativi una semplice statistica descrittiva. Queste prassi non sono cambiate fino ad oggi.⁷⁹

Infine, UNI EN ISO 15189:2023 prescrive al punto 7.3.7.3 che i dati VEQ devono essere rivisti a intervalli regolari con criteri di accettabilità specificati, in un arco di tempo che consenta un'indicazione significativa delle prestazioni attuali. Se i risultati VEQ non rientrano nei criteri di accettabilità specificati, devono essere intraprese azioni appropriate (si rimanda al punto 8.7), compresa una valutazione per stabilire se la non conformità è clinicamente significativa in relazione ai campioni dei pazienti. Qualora si determini che l'impatto è clinicamente significativo, si deve prendere in considerazione una revisione dei risultati dei pazienti che potrebbero essere stati influenzati e la necessità di una modifica, avvisando gli utenti in modo appropriato.

⁷⁹ Pasotti F, Pellegrinelli L, Liga G, et al. First Results of an External Quality Assessment (EQA) Scheme for Molecular, Serological and Antigenic Diagnostic Test for SARS-CoV-2 Detection in Lombardy Region (Northern Italy), 2020-2022. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(6):1483. Published 2022 Jun 16. doi:10.3390/diagnostics12061483

Commento generale ai requisiti di VEQ secondo ISO 15189

I requisiti per VEQ di ISO 15189 non vanno sottovalutati. Non raramente la partecipazione con successo a VEQ è tra le poche evidenze che consentono nelle verifiche di accreditamento di confermare la competenza del laboratorio, Talvolta addirittura l'unica. Infatti, ISO prescrive la partecipazione a VEQ, o almeno per le sue alternative, anche per gli esami POCT.

Inoltre, dalle VEQ si ricavano spesso informazioni sullo stato dell'arte generale dei metodi di esame anche prima insospettite, indispensabili per la sorveglianza postvendita prescritta dai Regolamenti Europei.^{80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87}

I programmi di VEQ si differenziano dalle attività di CQI innanzitutto per la frequenza delle misurazioni di controllo e il valore retrospettivo dei risultati. È perciò impossibile utilizzare la VEQ per la revisione e il rilascio dei risultati degli esami in tempo reale, anche se ISO mantiene la possibilità di rivedere a posteriori i risultati già rilasciati ed eventualmente procedere alla loro correzione. I risultati di VEQ non possono certamente essere utilizzati come funzioni "passa/non passa".

Invece ai fini delle stime di precisione, esattezza e incertezza i programmi di VEQ, se adeguatamente progettati e realizzati, possono dare validi contributi. Inoltre, negli esercizi di VEQ non si rilevano

⁸⁰ Birmingham Quality. The Role of EQA. <https://birminghamquality.org.uk/role-of-eqa/>

⁸¹ Braga F, Pasqualetti S, Panteghini M. The role of external quality assessment in the verification of in vitro medical diagnostics in the traceability era. Clin Biochem. 2018;57:23-28. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.02.004

⁸² REGOLAMENTO (UE) 2017/746 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 5 aprile 2017 relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro e che abroga la direttiva 98/79/CE e la decisione 2010/227/UE della Commissione <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0746&from=LV>

⁸³ Sciacovelli, Laura, Padoan, Andrea, Aita, Ada, Basso, Daniela and Plebani, Mario. "Quality indicators in laboratory medicine: state-of-the-art, quality specifications and future strategies" Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), vol. 61, no. 4, 2023, pp. 688-695. <https://doi.org/10.1515/cclm-2022-1143>

⁸⁴ Monogioudi, Evanthia, Martos, Gustavo, Hutu, Dana Petronela, Schimmel, Heinz, Meroni, Pier Luigi, Sheldon, Joanna and Zegers, Ingrid. "Standardization of autoimmune testing – is it feasible?" Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), vol. 56, no. 10, 2018, pp. 1734-1742. <https://doi.org/10.1515/cclm-2017-1077>

⁸⁵ Sack, U., Bossuyt, X., Andreeva, H. et al. Quality and best practice in medical laboratories: specific requests for autoimmunity testing. Autoimmun Highlights 11, 12 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13317-020-00134-0>

⁸⁶ Badrick T. Integrating quality control and external quality assurance. Clin Biochem. 2021;95:15-27. doi:10.1016/j.clinbiochem.2021.05.003

⁸⁷ European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). External quality assessment (EQA) of the performance of laboratories participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/EQA-20220125-31.pdf>



Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio

Componente della *World Association of Societies of Pathology
and Laboratory Medicine* www.sipmel.it

Commissione Nazionale Qualità ed Accreditemento
Gruppo di Studio Informatica *Coordinatore: Marco Pradella*
Gruppo di Studio sul Management sanitario
Coordinatore: Giovanni Casiraghi

Certificazione ISO



documento Q19
validità risultati

*Approvato dal Consiglio Nazionale
del 27/2/2024 - **Versione 1.0***

particolari difficoltà nella valutazione dei risultati nominali qualitativi rispetto quelli numerici quantitativi. Il passaggio dai tradizionali parametri di posizione e dispersione (media, varianza, scarto tipo) alle frequenze anche percentuali di concordanza avviene senza traumi e può essere un modello utile anche per il CQI, se realizzato con materiali adatti, ovvero vicini alla soglia decisionale. La disamina dei requisiti delle VEQ secondo ISO 17043 va oltre il campo di applicazione di questo documento. Invece, vanno evidenziati i requisiti della partecipazione del laboratorio ai confronti tra laboratori. In generale, ISO esclude il comportamento passivo, dalla scelta del programma di VEQ alla revisione dei risultati. Ogni scelta va adeguatamente motivata e documentata, anche per consentire agli ispettori di accreditamento un giudizio corretto di conformità ai requisiti in base alle evidenze.



Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio

Componente della *World Association of Societies of Pathology
and Laboratory Medicine* www.sipmel.it

Commissione Nazionale Qualità ed Accredimento
Gruppo di Studio Informatica *Coordinatore: Marco Pradella*
Gruppo di Studio sul Management sanitario
Coordinatore: Giovanni Casiraghi

Certificazione ISO



documento Q19
validità risultati

*Approvato dal Consiglio Nazionale
del 27/2/2024 - Versione 1.0*

Comparabilità dei risultati degli esami

Nel punto 7.3.7.4 di ISO 15189 non compare più il concetto di “monitoraggio”, che si vedeva in 7.3.7.1, 7.3.7.2 e 7.3.7.3. Tuttavia, la norma chiede che quando per un esame vengono utilizzati metodi o apparecchiature diversi, o l'esame viene eseguito in siti diversi, deve essere specificata una procedura per stabilire la comparabilità dei risultati per i campioni dei pazienti negli intervalli clinicamente significativi. L'uso di campioni di pazienti per il confronto di diversi metodi di esame può evitare le difficoltà legate alla limitata commutabilità dei materiali CQI. Quando i campioni dei pazienti non sono disponibili o non sono praticabili, vedere tutte le opzioni descritte per CQI e VEQ. Il laboratorio deve registrare i risultati della comparabilità effettuata e la sua accettabilità. Il laboratorio deve riesaminare periodicamente la comparabilità dei risultati. Se vengono identificate differenze, si valuta e si agisce sull'impatto di tali differenze sugli intervalli biologici di riferimento e sui limiti decisionali clinici. Il laboratorio deve informare gli utenti di eventuali differenze clinicamente significative nella comparabilità dei risultati.

NOTA su confronto di metodi.

Non abbiamo un solo modo per confrontare i metodi. Il vocabolario internazionale di metrologia (VIM) distingue due possibilità e due nomi diversi: comparabilità e confrontabilità.⁸⁸

[VIM3] 2.46 comparabilità metrologica dei risultati di misurazione o comparabilità metrologica è caratteristica dei risultati di misura che sono metrologicamente riconducibili allo stesso riferimento. Concetto che corrisponde esattamente al punto ISO 15189 7.3.7.2 lettera c) punto 2) confronto tra i risultati di campioni di pazienti e i risultati esaminati con una procedura alternativa convalidata per avere una taratura tracciabile metrologicamente, come specificato nella norma ISO 17511.

Invece [VIM3: 2.47] compatibilità metrologica si ha quando il valore assoluto della differenza di una qualsiasi coppia di valori misurati da due diversi risultati di misura sia minore di un multiplo scelto dell'incertezza standard di tale differenza. Questo concetto corrisponde alle procedure descritte da CLSI EP31 e CLSI EP09 (Figura 2).

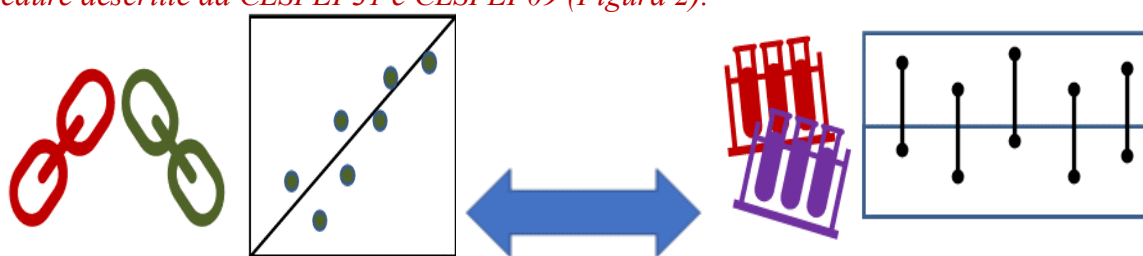


Figura 2. Schema della comparabilità dei risultati (a sinistra) e della compatibilità dei risultati (a destra) secondo VIM

ISO 15189 propone di aggiungere ai controlli di qualità i confronti tra strumenti, con campioni di pazienti, con campioni di controllo o con qualcuna delle numerose alternative previste per il CQI e VEQ. Per non lasciare i laboratori nell'imbarazzo della scelta di una strategia, è necessario raccogliere alcune informazioni di approfondimento.

⁸⁸ Joint Commission for Guides in Metrology (JCGM) International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM) 3rd edition.

NOTA su comparazione con risultati di pazienti secondo CLSI EP31, CLSI EP09 e guida SIPMeL

CLSI EP31 tratta la verifica della comparabilità dei risultati dei pazienti all'interno di un sistema sanitario.⁸⁹ Documento pubblicato nel 2012, confermato nel 2017, era programmato per la revisione nel 2022. Invece della revisione, CLSI ha affiancato una guida all'attuazione: EP31IG.⁹⁰

Il fatto che un documento "provvisorio (interim)" sia rimasto valido per dieci anni e poi di fatto per altri cinque, generando non una revisione ma una "guida applicativa", può lasciare perplessi.

CLSI EP31 sostituisce il documento C54-A-IR del 2008.

EP31 è inteso per verificare la comparabilità dei risultati dei pazienti in situazioni come quelle successive a cambi di lotto di reagenti o calibratori, a cambi di componenti dello strumento o a procedure di manutenzione, ad allarmi provenienti da eventi di CQ o di valutazione esterna della qualità (VEQ) o ad altre cause speciali. Le verifiche di comparabilità sono classificate come monitoraggio frequente (ad esempio, giornaliero, settimanale), monitoraggio periodico (ad esempio, trimestrale, semestrale, eseguito quando il monitoraggio frequente non è ritenuto necessario perché i sistemi di misura sono stabili e il rischio di errori clinici dovuti a risultati non comparabili è basso), infine prove per cause speciali in risposta a un allarme proveniente da una procedura di monitoraggio o da un altro evento scatenante.

Il monitoraggio frequente in genere comporta il confronto di un numero inferiore di campioni o l'esecuzione di un numero inferiore di repliche di un singolo campione. In alternativa, il monitoraggio frequente può essere realizzato attraverso il monitoraggio statistico automatizzato dei risultati dei pazienti (ad esempio, medie mobili ponderate).⁹¹

EP31 prevede la possibilità di sorvegliare la comparabilità mediante i risultati del controllo di qualità (6.1.3.1). Questa procedura prevede un confronto iniziale, come verifica dei metodi, e successivamente il mantenimento delle relazioni numeriche tra le medie del controllo di qualità, che non dovrebbero cambiare se i metodi restano stabili. Chiama questi parametri "medie mobili" e avverte della difficoltà di gestione dei cambi di lotto del materiale di controllo, giungendo così a preferire il confronto con campioni di pazienti.

I campioni migliori per le prove di comparabilità sono quelli di pazienti, trattati (e conservati, se necessario) in base ai requisiti di stabilità. Un secondo materiale generalmente accettabile per i test di comparabilità è una miscela (pool) di campioni di pazienti, quando il numero delle prove di confronto è elevato. I campioni mescolati hanno il limite di non rappresentare adeguatamente i singoli campioni, perché le differenze tra i singoli campioni dei pazienti possono essere mascherate. La miscela di campioni può essere utile per valutare le differenze di taratura (bias).

I materiali di riferimento, i materiali di controllo e i materiali PT/EQA, commutabili con i campioni

⁸⁹ CLSI. Verification of Comparability of Patient Results Within One Health Care System; Approved Guideline (Interim Revision). CLSI document EP31-A-IR. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012, confermato nel 2017.

⁹⁰ CLSI EP31IG. Verification of Comparability of Patient Results Within One Health Care System Implementation Guide, 1st Edition. 2022.

⁹¹ Linnet K. The exponentially weighted moving average (EWMA) rule compared with traditionally used quality control rules. Clin Chem Lab Med. 2006;44(4):396-399

dei pazienti, sono adatti per i test di comparabilità. Poiché i materiali di controllo spesso non sono commutabili con i campioni clinici, i risultati possono fornire una relazione numerica tra i sistemi di misurazione che non riflette la vera relazione osservata per i campioni dei pazienti. Può essere più pratico eseguire un monitoraggio frequente o periodico della comparabilità utilizzando campioni di pazienti nativi piuttosto che condurre la validazione necessaria per basare il monitoraggio sui risultati del CQ. Anche i materiali usati per VEQ possono essere considerati. Invece i materiali di verifica della linearità e i calibratori del produttore non sono raccomandati, poiché non sono destinati a essere commutabili con i campioni dei pazienti.

CLSI EP31 si occupa in particolare degli esami POCT, che presentano molte difficoltà: tipo di campione, tipo di prelievo, misura non tradizionale, ad esempio transcutanea.

Per CLSI EP31 i risultati delle prove di comparabilità vengono elaborati con una statistica poco conosciuta, basata sui dati ordinati.⁹² Si tratta di numeri posti in ordine crescente, su cui si stima come tendenza centrale la mediana e come dispersione l'intervallo (range) o campo di variazione, ovvero la differenza tra ultimo risultato (X_n) e primo (X_1).

La proposta di EP31 prevede confronti fino a 10 strumenti e fino a due serie, mentre i replicati sono da calcolare. Per il calcolo servono i dati della differenza critica (CD), la precisione nella serie (SR) e la precisione totale (ST). Le tabelle riportano i risultati dei calcoli: il numero di replicati per una serie può variare da 1 a 444 a seconda dei valori dei parametri citati. Tuttavia, quando il test del campo non è applicabile, come nel caso degli esami POCT, sono chiamati in causa protocolli alternativi, come quelli della griglia degli errori.^{93, 94}

Esperienze più recenti, non considerate da EP31, usano statistiche come ANOVA Kruskal-Wallis, applicate a numeri come più di 50 campioni.⁹⁵ Oppure la regressione di Passing-Bablok e l'analisi delle differenze secondo Bland-Altman su numeri superiori a 150 campioni.⁹⁶ In altri casi viene usato un semplice test statistico t per dati accoppiati.⁹⁷

⁹² David HA, Nagaraja HN. Order Statistics. 3rd ed. Hoboken, NJ: Wiley InterScience; 2003.

⁹³ Stöckl D, Dewitte K, Fierens C, Thienpont LM. Evaluating clinical accuracy of systems for self-monitoring of blood glucose by error grid analysis: comment on constructing the "upper A-line." Diabetes Care. 2000;23(11):1711-1712.

⁹⁴ Parkes JL, Slatin SL, Pardo S, Ginsberg BH. A new consensus error grid to evaluate the clinical significance of inaccuracies in the measurement of blood glucose. Diabetes Care. 2000;23(8):1143-1148.

⁹⁵ Wang, Qian, Du, Jin, Chen, Lin, Du, Yu-di and Luo, Wei. "Comparison of POCT glucose meters and analysis of the interference factor" Journal of Laboratory Medicine, vol. 46, no. 3, 2022, pp. 195-201. <https://doi.org/10.1515/labmed-2021-0171>

⁹⁶ Wei H, Lan F, He Q, Li H, Zhang F, Qin X, Li S. A Comparison Study Between Point-of-Care Testing Systems and Central Laboratory for Determining Blood Glucose in Venous Blood. J Clin Lab Anal. 2017 May;31(3):e22051. doi: 10.1002/jcla.22051. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27558572; PMCID: PMC6817021.

⁹⁷ Petersen JR, Graves DF, Tacker DH, Okorodudu AO, Mohammad AA, Cardenas VJ Jr. Comparison of POCT and central laboratory blood glucose results using arterial, capillary, and venous samples from MICU patients on a tight glycemic protocol. Clin Chim Acta. 2008;396(1-

CLSI EP31IG, pubblicata nel settembre 2022, contiene la guida all'attuazione della verifica della comparabilità dei risultati dei pazienti secondo EP31.⁹⁸ Si avvale del documento collegato CLSI EP31-Ed1-WB, che contiene tabelle e calcoli.⁹⁹ Per la selezione dei campioni e per gli esami POCT, ripete in sintesi i contenuti di CLSI EP31-A-IR.

Il documento CLSI EP09 è invece il principale riferimento per il confronto tra procedure di misurazione utilizzando campioni di pazienti, arrivato alla terza edizione nel 2018.¹⁰⁰ EP09 distingue la procedura per il fabbricante da quella per il laboratorio. Il laboratorio è tenuto a esaminare solo 40 campioni, non 100 come il fabbricante, e può limitare l'analisi dei risultati al grafico delle differenze, mentre al fabbricante è richiesta un'analisi completa della regressione. Un grafico delle differenze presenta i risultati di uno studio di confronto tra procedure di misurazione, con la concentrazione del misurando sull'asse orizzontale e la differenza tra la procedura di misurazione candidata e quella di confronto sull'asse verticale. Il diagramma di Bland-Altman 22 è un esempio di diagramma delle differenze.¹⁰¹

SIPMeL ha analizzato le proposte di EP31 e di EP09 con le sue Raccomandazioni.¹⁰² Si concludeva che, nonostante le dichiarate intenzioni, la proposta di EP31 appare molto più complicata da realizzare, mentre quella di EP09 resta meno impegnativa pur mantenendo per il laboratorio la massima rigosità scientifica richiesta per le sue attività.

Commento generale alla comparazione dei risultati secondo ISO 15189

I requisiti fissati da ISO 15189 nel punto 7.3.7.4 lasciano aperte alcune perplessità.

Non vengono dati riferimenti sulle procedure da seguire e sulle statistiche per l'interpretazione dei risultati. Le guide più autorevoli in materia sono quelle CLSI, che però si sviluppano in due direzioni diverse, quella di EP09, più classica, e quella di EP31, più elaborata.

2):10-13. doi:10.1016/j.cca.2008.06.010

⁹⁸ CLSI EP31IG. Verification of Comparability of Patient Results Within One Health Care System Implementation Guide, 1st Edition. 2022.

⁹⁹ CLSI. Verification of Comparability of Patient Results Within One Health Care System Workbook. 1st ed. CLSI workbook EP31-Ed1-WB. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2022.

¹⁰⁰ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. 3rd ed. CLSI guideline EP09c (ISBN 978-1-68440-006-5 [Print]; ISBN 978-1-68440-007-2 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2018.

¹⁰¹ Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. Stat Methods Med Res. 1999;8(2):135-160.

¹⁰² Pradella M, Cesana BM (2016) Linee guida per il confronto di procedure di esami di laboratorio: utilizzo delle indicazioni di CLSI EP09-A3 ed EP31-A-IR. Riv Ital Med Lab 12:26-35. <https://doi.org/10.1007/s13631-016-0110-1>

La prassi descritta da CLSI EP31 al punto 6.1.3.1 merita una particolare attenzione. EP31 non ne fornisce i riferimenti e usa senza motivo l'espressione "medie mobili" in questo contesto, introducendo un'ambiguità con altre "medie mobili". È la prassi che richiede meno dispendio di risorse, tempo ed energia, perché il CQI viene comunque mantenuto nei vari sistemi. Non richiede statistiche sofisticate. La preoccupazione sul cambio di lotto è ingiustificata, se viene rispettata l'indicazione di CLSI C24 a embriare i lotti diversi del materiale di controllo.

Le indicazioni di ISO 15189 sulla selezione dei campioni lasciano aperte molte possibilità, letteralmente "tutte le opzioni descritte per CQI e VEQ", esponendo i laboratori a molti rischi.

Ma soprattutto è evidente la differenza tra 7.3.7.4 e i punti precedenti nel capitolo 7.3.7, il cui esordio si riferisce alla necessità di garantire il monitoraggio della validità dei risultati. Infatti, CQI e VEQ sono attività eseguite in modo continuativo, pur se con frequenza diversa. Difficile pensare alla verifica della comparazione tra metodi condotta con elevata frequenza, anche se EP31 ne adombra la possibilità. Qualunque protocollo si applichi, il confronto tra metodi è un'attività impegnativa e costosa, che non può essere ripetuta con elevata frequenza. È difficile individuare la differenza tra le procedure di 7.3.7.4 e quelle di 7.3.2 (verifica dei metodi), che alla lettera c) si collega proprio alla validità dei risultati, nonché i requisiti di 7.3.1, dove alla lettera e) prevede la rivalutazione periodica dei metodi. Probabilmente, tutto il punto 7.3.7.4, che non è presente in ISO 17025, sarebbe da collocare con il punto 7.3.2.¹⁰³

Conclusioni e raccomandazioni

Dopo la pubblicazione del documento ISO 20914¹⁰⁴, il CQI ha assunto una valenza molto più ampia del semplice monitoraggio quotidiano della validità dei risultati, diventando la base per la stima dell'incertezza di misura nei laboratori medici, come stabilito da ISO 15189 al punto 7.3.4. Le modalità per realizzare il CQI, la scelta dei materiali, la frequenza, le statistiche, meritano perciò una particolare attenzione aggiuntiva in tutti i settori del laboratorio medico, compresi i servizi POCT. La partecipazione ai programmi VEQ è fondamentale per la conferma della competenza del laboratorio medico anche ai fini dell'accreditamento ISO, ma fornisce informazioni insostituibili anche sullo stato dell'arte degli esami e sul livello di fiducia accordabile ai risultati, in particolare se ottenuti da laboratori diversi.

I laboratori medici sono caratterizzati dalla presenza di strumenti diversi per l'esecuzione degli stessi esami, cosa che per ISO sembra differenziarli in modo significativo dai laboratori di prova conformi a ISO 17025. Impostare le procedure di verifica dei metodi e di garanzia della validità dei risultati in queste realtà non è un compito da sottovalutare e improvvisare, per il quale si devono rispettare i principi della metrologia e la realtà oggettiva delle risorse umane, economiche e di conoscenza scientifica a disposizione.

Si possono quindi esprimere le seguenti Raccomandazioni:

¹⁰³ Pradella M. New ISO standards for medical biology laboratories, prescriptions and deviations. Volume 80, issue 5, September-October 2022. *Annales de Biologie Clinique*. 2022;80(5):451-453. doi:10.1684/abc.2022.1755

¹⁰⁴ UNI ISO/TS 20914:2023. Laboratori medici - Guida pratica per la stima dell'incertezza di misura

<p>1. Si raccomanda ai laboratori di avvicinarsi ai requisiti di ISO 15189:2022 anche prima di avviare un percorso di accreditamento con un organismo che operi in conformità alla norma ISO/IEC 17011.</p> <p>2. Si può altresì raccomandare di considerare i requisiti di ISO 9001 come utile predisposizione ai requisiti di ISO 15189 in tutti i capitoli, non solo nel capitolo 8 "Sistema di gestione".</p> <p>3. Per evitare le insidie dei testi normativi in lingua inglese, si raccomanda di utilizzare le versioni tradotte o le raccomandazioni nazionali in lingua italiana (ISO 15189 7.3.6 lettera b).</p> <p>4. Si raccomanda ai laboratori di avvicinarsi ai requisiti di ISO 15189:2022 anche prima di avviare un percorso di accreditamento con un organismo che operi in conformità alla norma ISO/IEC 17011.</p> <p>5. Si può altresì raccomandare di considerare i requisiti di ISO 9001 come utile predisposizione ai 26 requisiti di ISO 15189 in tutti i capitoli, non solo nel capitolo 8 "Sistema di gestione".</p> <p>6. Si raccomanda che il laboratorio si prenda cura del controllo di qualità interno sia per assicurare costantemente la validità dei risultati dei pazienti che per sorvegliare le caratteristiche prestazionali dei metodi a partire dall'incertezza di misura.</p> <p>7. Per l'attuazione dei principi enunciati da ISO 15189 sul CQI, ai laboratori conviene riferirsi principalmente al documento ISO 15198 e al documento CLSI C24, anche per la determinazione della frequenza delle misure</p>	<p>1. Laboratories are recommended to approach the requirements of ISO 15189:2022 even before starting an accreditation process with a body operating in accordance with ISO/IEC 17011.</p> <p>2. It is also recommended to consider the requirements of ISO 9001 as a useful predisposition to the requirements of ISO 15189 in all chapters, not only in Chapter 8 'Management System'.</p> <p>3. In order to avoid the pitfalls of English-language regulatory texts, it is recommended to use the translated versions or national recommendations in Italian (ISO 15189 7.3.6 letter b).</p> <p>4. Laboratories are recommended to approach the requirements of ISO 15189:2022 even before starting an accreditation process with a body operating in accordance with ISO/IEC 17011.</p> <p>5. It can also be recommended to consider the requirements of ISO 9001 as a useful predisposition to the 26 requirements of ISO 15189 in all chapters, not only in Chapter 8 'Management System'.</p> <p>6. It is recommended that the laboratory takes care of internal quality control both to continuously ensure the validity of patient results and to monitor the performance characteristics of methods from the measurement uncertainty.</p> <p>7. For the implementation of the principles set out in ISO 15189 on IQC, laboratories should mainly refer to ISO 15198 and CLSI document C24, also for the determination of the frequency of measurements on control</p>
---	--

<p>su materiali di controllo.</p> <p>8. A seconda delle attività di immunologia svolte nel laboratorio, sono da considerare riferimenti per il CQI secondo i principi di ISO 15198 i documenti CLSI I/LA02, I/LA23, I/LA28.</p> <p>9. A seconda delle attività di microbiologia svolte nel laboratorio, sono da considerare riferimenti per il CQI secondo i principi di ISO 15198 i documenti CLSI M22, M27, M35, M40, M58 e il documento Q2 di UK-SMI.</p> <p>10. A seconda degli esami molecolari eseguiti nel laboratorio, sono da considerare riferimenti per il CQI secondo i principi di ISO 15198 i documenti ISO 17822 e CLSI MM01, MM07, MM09, MM13, MM20, MM22, MM23.</p> <p>11. La terminologia “controlli interni” e “controlli esterni” è da sostituire con espressioni senza ambiguità come “controlli inclusi” e “controlli non inclusi” o “controlli aggiunti”.</p> <p>12. Per gli esami eseguiti nei POCT, sono da considerare riferimenti per il CQI secondo i principi di ISO 15198 i documenti CLSI POCT07, POCT08, POCT14.</p> <p>13. I materiali utilizzati nella modalità “passa/non passa”, ovvero prima dell’esecuzione dell’esame sui campioni dei pazienti, non soddisfano pienamente i requisiti ISO 15189 per il CQI per il monitoraggio della validità, quindi dovrebbero essere affiancati da altre procedure a questo scopo, se possibile.</p>	<p>materials.</p> <p>8. Depending on the immunology activities carried out in the laboratory, the CLSI documents I/LA02, I/LA23, I/LA28 are to be considered references for IQC according to the principles of ISO 15198.</p> <p>9. Depending on the microbiology activities carried out in the laboratory, the CLSI documents M22, M27, M35, M40, M58 and the UK-SMI Q2 document are to be considered references for IQC according to the principles of ISO 15198.</p> <p>10. Depending on the molecular tests performed in the laboratory, the ISO 17822 and CLSI documents MM01, MM07, MM09, MM13, MM20, MM22, MM23 are to be considered references for IQC according to the principles of ISO 15198.</p> <p>11. The terminology 'internal controls' and 'external controls' should be replaced with unambiguous expressions such as 'included controls' and 'non-included controls' or 'added controls'.</p> <p>12. For examinations performed in POCTs, the CLSI documents POCT07, POCT08, POCT14 are to be considered references for IQC according to the principles of ISO 15198.</p> <p>13. Materials used in the 'pass/fail' mode, i.e. prior to examination of patient samples, do not fully meet the ISO 15189 requirements for IQC for validity monitoring, so they should be supplemented by other procedures for this purpose if possible.</p> <p>14. Alternative procedures for IQC can be adopted in the laboratory on the basis of</p>
---	---

<p>14. Le procedure alternative per il CQI possono essere adottate nel laboratorio sulla base di solide motivazioni, profonda conoscenza della loro natura, grande prudenza nella valutazione dei risultati.</p> <p>15. Come per l'incertezza di misura, il CQI con le tecniche standard va applicato sia ai metodi con risultati numerici quantitativi che alle misurazioni quantitative dei metodi che portano a risultati finali nominali qualitativi (positivo/negativo, presente/assente), anche quando il processo dell'esame è particolarmente complicato.</p> <p>16. Per alcuni processi di esame sono da utilizzare nel CQI metriche generate dal processo stesso, non dalle misure su campioni di controllo.</p> <p>17. Si raccomanda al laboratorio di sviluppare procedure per la sorveglianza della validità dei risultati anche per i metodi con risultati nominali qualitativi o numerici ordinali, sulla base delle guide EURACHEM e ISO 27877.</p> <p>18. La partecipazione del laboratorio a programmi di VEQ va prevista per tutti gli esami, compresi quelli nei servizi POCT.</p> <p>19. Per le modalità della partecipazione ai programmi VEQ al laboratorio conviene far riferimento alla guida CLSI QMS24 e, per gli esami molecolari, MM14.</p> <p>20. La scelta di alternative alle VEQ offerte nel mercato va corredata di adeguata motivazione e valutazione del rischio.</p> <p>21. La comparazione dei risultati tra metodi diversi è una delle attività di verifica, non si presta alla sorveglianza della validità dei</p>	<p>sound reasons, thorough knowledge of their nature, and great prudence in evaluating the results.</p> <p>15. As with measurement uncertainty, IQC with standard techniques should be applied to both methods with quantitative numerical results and quantitative measurements of methods leading to qualitative nominal final results (positive/negative, present/absent), even when the examination process is particularly complicated.</p> <p>16. For some examination processes, metrics generated by the process itself, not by measurements on control samples, are to be used in the IQC.</p> <p>17. It is recommended that the laboratory also develop procedures for monitoring the validity of results for methods with nominal qualitative or numerical ordinal results, based on the EURACHEM and ISO 27877 guides.</p> <p>18. The laboratory's participation in VEQ programmes should be envisaged for all examinations, including those in POCT services.</p> <p>19. It is recommended to refer to the CLSI guide QMS24 and, for molecular examinations, MM14 for the modalities of participation in VEQ programmes at the laboratory.</p> <p>20. The choice of alternatives to VEQs offered in the market must be accompanied by adequate justification and risk assessment.</p> <p>21. The comparison of results between different methods is one of the verification activities, and does not lend itself to the surveillance of</p>
--	--

<p>risultati, nonostante ISO 15189 inserisca il paragrafo nel punto 7.3.7. A meno che non rientri nelle alternative alla VEQ.</p> <p>22. La comparabilità metrologica richiede la condivisione della tracciabilità metrologica, ovvero la stessa taratura.</p> <p>23. La compatibilità metrologica può essere stimata, nell'ambito della verifica dei metodi, con il confronto dei risultati di campioni di pazienti, secondo la guida CLSI EP09 e le Raccomandazioni SIPMeL sul tema, avvalendosi delle semplificazioni previste appunto per i laboratori.</p> <p>24. Per gli esami nei servizi POCT, il metodo della griglia degli errori descritto in letteratura presenta un livello di difficoltà e impegno accettabile per i laboratori medici.</p> <p>25. Indipendentemente dal metodo di verifica di comparabilità o compatibilità, il mantenimento di stabilità della caratteristica è assicurato dalla corretta esecuzione del CQI, non da ripetuti frequenti esperimenti, impegnativi e onerosi.</p>	<p>the validity of results, despite the fact that ISO 15189 includes the paragraph in 7.3.7. Unless it is part of the alternatives to VEQ.</p> <p>22. Metrological comparability requires shared metrological traceability, i.e. the same calibration.</p> <p>23. Metrological compatibility can be estimated, as part of the verification of methods, by comparing the results of patient samples, according to the CLSI guide EP09 and the SIPMeL Recommendations on the subject, making use of the simplifications provided precisely for laboratories.</p> <p>24. For examinations in POCT services, the error grid method described in the literature presents an acceptable level of difficulty and effort for medical laboratories.</p> <p>25. Regardless of the method of verifying comparability or compatibility, the maintenance of the stability of the characteristic is ensured by the correct execution of the IQC, not by frequent, time-consuming and costly experiments.</p>
---	--

Tabella. Materiali per il CQI e per la stima di precisione

Fonte	Campo	Controlli
ISO 15189:2022	Laboratori medici	<ul style="list-style-type: none"> • Materiale stabile, matrice pazienti, livelli decisione • media mobile dei risultati dei pazienti • percentuale risultati inferiori o superiori soglia • risultati procedura taratura riferibile ISO 17511 • riesame dei campioni conservati di pazienti (RPT-QC)
WHO 2011	Risultati qualitativi	<ul style="list-style-type: none"> • positivo e negativo (almeno quotidiani) • negativo, positivo debole, positivo forte (agglutinazione) • controlli integrati nel dispositivo • ceppi standard ATCC, NCTC, Istituto Pasteur
CLSI I/LA02 2006	Autoanticorpi antinucleo	<ul style="list-style-type: none"> • positivo e negativo a livelli decisione (ogni seduta) • riesame dei campioni conservati di pazienti (concordanza) • frequenza risultati negativi, incerti o positivi
CLSI I/LA23 2004 (non più revisionato)	Radioimmunologia, immunoenzimatica, immunofluorescenza , immunochemilumine scenza	<ul style="list-style-type: none"> • campioni di controllo • intercetta e pendenza della taratura • percentuale legato (%B/T) per due calibratori (RIA) • CPM corretti per i calibratori (RIA) • Coefficiente determinazione regressione taratura
CLSI I/LA28 2011	Immunoistochimica	<ul style="list-style-type: none"> • Microvettori tessutali standardizzati (TMA) (colorati o non colorati) • Tessuto debolmente positivo e tessuto negativo • Reagente non specifico negativo (o diluente) • Frequenza risultati positivi (soglia 1+). test esatto Fisher-Freeman-Halton
CLSI M22 2014	Terreni microbiologia	<ul style="list-style-type: none"> • Ceppi standard ATCC (Tassi di insuccesso) • Organismi isolati fenotipo stabile (Tassi di insuccesso)
CLSI M27M44S 2022 CLSI M27 2017	Antimicogramma lieviti	<ul style="list-style-type: none"> • Ceppi standard ATCC (MIC o diametro, quotidiano, regole 1/20 o 3/30) • Controllo crescita • Controllo purezza • Controllo dell'interpretazione del punto finale
CLSI M38M51S 2022	Antimicogramma filamentosi	<ul style="list-style-type: none"> • Ceppi standard ATCC (MIC o MEC, quotidiano, regole 1/20 o 3/30) • Controllo crescita

CLSI M38 2017		<ul style="list-style-type: none"> • Controllo purezza • Controllo dell'interpretazione del punto finale
CLSI M40 2014	Trasporto microbiologia	<ul style="list-style-type: none"> • Ceppi standard ATCC (solo fabbricante) • Ceppi del fabbricante (solo fabbricante) • Controlli inibizione in NAAT • Recupero virus (ATCC HSV, influenza A, CMV)
CLSI M50 2008 (non più revisionato)	Identificazione microbiologia	<ul style="list-style-type: none"> • Controllo semplificato ceppi standard o commerciali, ogni nuovo lotto o spedizione, positivo e negativo per ciascun reagente (regola 95% concordanza fabbricante)
CLSI M58 2017	MALDI-TOF	<ul style="list-style-type: none"> • Ceppi positivi (3-5 di ciascuna specie, campioni freschi con aggiunta di ceppi standard, indicati dal fabbricante) • Controllo negativo (solo reagente)
CLSI POCT07	POCT	<ul style="list-style-type: none"> • Controlli non specificati
CLSI POCT08	POCT non strumentale	<ul style="list-style-type: none"> • Controlli interni al dispositivo • Controlli esterni al dispositivo (positivo e negativo, normale e anormale)
CLSI POCT14	POCT coagulazione	<ul style="list-style-type: none"> • Controlli interni ("a bordo") • Cartucce elettroniche • Controlli liquidi
ISO 17822	Qualità NAAT	<ul style="list-style-type: none"> • Controlli interni al campione (aggiunti alla matrice del campione) • Controlli esterni al campione, con statistica
ISO 20397-2	Qualità NGS	<ul style="list-style-type: none"> • Metriche dati grezzi • Metriche qualità • Metriche mappatura • Metriche controllo qualità • Metriche chiamate varianti
CLSI MM09	Genetica e genomica	<ul style="list-style-type: none"> • Estrazione DNA (UV, qPCR) • Metriche specifiche della tecnica
CLSI MM22	Esami a micromatrice	<ul style="list-style-type: none"> • Controlli inclusi • Controlli non inclusi (aggiunti), negativi e positivi, secondo il piano individualizzato

Legenda: CQI: controllo qualità interno; ATCC: American Type Culture Collection; NCTC: National Collection of Type Cultures; RIA: esami radioimmunologici; TMA: • Microvettori tessutali standardizzati; MIC: minimal inhibitory concentration; MEC: minimal effective concentration; MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight; POCT: esami al punto di cura; NAAT: esami con amplificazione di acidi nucleici; HSV: virus herpes simplex; CMV: citomegalovirus; DNA: acido desossiribonucleico; UV: ultravioletto; qPCR: Reazione a catena della polimerasi inversa quantitativa..