

Raccomandazioni per Accreditamento ISO 15189 del laboratorio medico: requisiti per taratura, verifica, valutazione dei metodi e incertezza dei risultati

Recommendations for Medical Laboratory ISO 15189 Accreditation: Requirements for Calibration, Verification, Method Evaluation and Uncertainty of Results

Codifica di questo documento:

Flusso Operativo	Elementi fondamentali del sistema qualità	
Pre-esame 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 Analisi E	Acquisti e gestione scorte P	
Revisione e flusso dei risultati F	Controllo del processo Q	#
Interpretazione di laboratorio G	Gestione delle informazioni R	
Post-esame 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	

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

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/TS 22583:2021. Guida per supervisori e operatori di dispositivi di test point-of-care (POCT)

ISO 15190:2020. Medical laboratories - Requirements for safety.

UNI CEI EN ISO 17034:2017 Requisiti generali per la competenza dei produttori di materiali di riferimento

UNI EN ISO 15193:2009. Dispositivi medico-diagnostici in vitro - Misura di grandezze in campioni di origine biologica - Requisiti relativi al contenuto e alla presentazione delle procedure di misura di riferimento

UNI EN ISO 15194:2009 Dispositivi medico-diagnostici in vitro - Misura di grandezze in campioni di origine biologica - Requisiti relativi ai materiali di riferimento certificati e al contenuto della documentazione di supporto

UNI EN ISO 15195:2019. Medicina di laboratorio - Requisiti per la competenza dei laboratori di taratura che utilizzano procedure di misura di riferimento

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

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

ISO/TS 16393:2019. Molecular biomarker analysis – Determination of the performance characteristics of qualitative measurement methods and validation of methods. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.

INDICE.....	
Codifica di questo documento:	1
Riferimenti normativi.....	2
Introduzione: la revisione di ISO 15189.....	4
NOTA di ortografia.	5
Le risorse del laboratorio medico (ISO 15189 capitolo 6)	6
Taratura delle apparecchiature e tracciabilità metrologica (ISO 15189 6.5)	6
NOTA. Taratura da risorse a verifica validazione metodi.....	6
NOTA. Traduzione di “traceability”	6
NOTA. Risultati qualitativi e quantitativi discreti	7
NOTA. Metodi senza tracciabilità metrologica	8
NOTA. Verifica di accuratezza per la taratura	10
NOTA. Laboratori di riferimento	11
NOTA. Compromessi nella tracciabilità metrologica.....	11
NOTA. Tracciabilità per gli esami di genomica.....	11
NOTA. Tracciabilità per risultati qualitativi	18
Requisiti di processo (ISO 15189 capitolo 7).....	21
Processi d'esame (clausola 7.3).....	21
NOTA. Fonti dei metodi	21
Validazione dei metodi di esame (punto 7.3.3).....	22
NOTA. Caratteristiche prestazionali e validità fondazionale.....	22
NOTA. Guide a verifica e validazione: il caso dell'amplificazione di acidi nucleici	24
NOTA. Guide generali a verifica e validazione dei metodi	26
NOTA. Guide per la capacità di rilevazione (LoB, LoD, LoQ).....	29
NOTA. Metriche di qualità per NGS	33
Accredia su prestazioni dei metodi	38
Verifica dei metodi d'esame (punto 7.3.2).....	39
NOTA. Periodicità delle verifiche.....	39
Valutazione dell'incertezza di misura (punto 7.3.4).....	39
NOTA. Guide all'incertezza di misura.....	40
NOTA. Incertezza di misura e risultati qualitativi	41
Accredia su Valutazione dell'incertezza di misura	46
Comparabilità dei risultati degli esami (punto 7.3.7.4).....	46
NOTA. Alternative per il confronto dei metodi	46
NOTA. Guide al confronto dei metodi.....	47
NOTA. Confronto metodi secondo guida CLSI e Raccomandazione SIPMeL	50
Commento generale alla comparazione dei risultati secondo ISO 15189	50
Conclusioni e raccomandazioni	52

Introduzione: la revisione di ISO 15189

SIPMeL ha già affrontato il tema delle risorse di personale, ambiente e attrezzature, anche per i servizi POCT, i punti prelievo e i laboratori in rete, con le Raccomandazioni dei documenti Q13 (POCT)^{1,2}, Q12 (prelievi)^{3,4}. Si deve tornare sull'argomento alla luce della revisione della norma ISO per l'accreditamento dei laboratori medici, affrontando in modo sistematico i temi delle risorse di personale, ambiente, attrezzature, consumabili, accordi di servizio.

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 pre-esame), 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 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.

¹ SIPMeL. Raccomandazioni per l'inclusione dei requisiti degli esami eseguiti vicino al paziente (point-of-care testing, ISO 22870) nei requisiti dei laboratori medici (ISO 15189). 07/10/2019. Documento Q13-POCT ISO 22870 in ISO 15189.

<https://www.sipmel.it/it/lineeguida/approvate/115525>

² Pradella M. Accreditamento dei POCT con la nuova ISO 15189 e ISO 22583: le raccomandazioni SIPMeL. La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio 2019 Settembre;15(3):225-32. DOI: 10.23736/S1825-859X.19.00037-9

³ SIPMeL. Raccomandazioni per l'accreditamento di punti di prelievo e laboratori in rete. 07/10/2019. Documento Q12- BC1 punti prelievo e laboratori in rete. <https://www.sipmel.it/it/lineeguida/approvate/116056>

⁴ Pradella M. Accreditamento ISO di punti di prelievo e laboratori in rete. La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio 2020 Marzo;16(1):50-9. DOI: 10.23736/S1825-859X.20.00046-8

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

In questa nota di raccomandazioni vengono presentati i punti salienti di UNI EN ISO 15189:2023 per la gestione dei metodi di esame, in particolare 6.5 (Taratura e tracciabilità metrologica) e dal capitolo 7 Requisiti di processo i punti 7.3.2 (Verifica dei metodi d'esame), 7.3.3 (Validazione dei metodi di esame), 7.3.4 (Valutazione dell'incertezza di misura), 7.3.7.4 (Comparabilità dei risultati degli esami),

NOTA di ortografia.

Come descritto dalla Accademia della Crusca,⁸ la lingua italiana si comporta diversamente dall'inglese. Per i prefissi 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, Treccani⁹ elenca numerosi esempi senza trattino (postpiliocene, 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.¹⁰ Ma anche: postbellico, postindustriale, postoperatorio, postrisorgimentale, postcomunismo.¹¹

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

⁹ Istituto della Enciclopedia Italiana fondata da Giovanni Treccani. Pòst- Vocabolario on line. <https://www.treccani.it/vocabolario/post/>

¹⁰ Nuovo De Mauro. Pre- <https://dizionario.internazionale.it/parola/pre->

¹¹ Nuovo De Mauro. Post- <https://dizionario.internazionale.it/parola/post->

Le risorse del laboratorio medico (ISO 15189 capitolo 6)

Taratura delle apparecchiature e tracciabilità metrologica (ISO 15189 6.5)

NOTA. Taratura da risorse a verifica validazione metodi

ISO 15189 inserisce il tema della taratura nel capitolo 6 risorse. Tuttavia, la natura dell'argomento consiglia di affiancare la clausola 6.5 a quelle dedicate a verifica e validazione dei metodi (7.3.2 e 7.3.3), all'incertezza di misura (7.3.4) nonché alla comparazione dei risultati (7.3.7.4).

ISO 15189 chiede di specificare requisiti di taratura e di tracciabilità sufficienti per mantenere coerenza dei risultati degli esami. Per i metodi quantitativi, le specifiche devono includere i requisiti di taratura e tracciabilità metrologica. I metodi qualitativi e quantitativi che misurano caratteristiche piuttosto che misurandi discreti devono specificare la caratteristica da valutare e i requisiti necessari per la riproducibilità nel tempo.

Esempi di metodi qualitativi e quantitativi che possono non consentire la tracciabilità metrologica sono la rilevazione degli anticorpi dei globuli rossi, la valutazione della sensibilità agli antibiotici, gli esami genetici, la velocità di sedimentazione degli eritrociti, la colorazione dei marcatori in citometria a flusso e la colorazione immunoistochimica del tumore HER2.

NOTA. Traduzione di "traceability"

ISO 15189 non contiene la definizione di "tracciabilità", nonostante la parola ricorra ben 19 volte nel testo, di cui due volte nei titoli dei paragrafi. Ci aiuta VIM3, che la descrive come "proprietà di un risultato di misura per cui esso è posto in relazione a un riferimento attraverso una documentata catena ininterrotta di tarature, ciascuna delle quali contribuisce all'incertezza di misura". Per le ragioni espresse nelle Raccomandazioni SIPMeL L5Q15 si mantiene la versione italiana "tracciabilità" per questa caratteristica.

La Raccomandazione SIPMeL L5Q15¹² ha affrontato la criticità della traduzione in italiano del lemma "3.31 metrological traceability" di ISO 17511. Si osserva che UNI traduce la Guida ISO 99 con "2.41 riferibilità metrologica"¹³ e riporta la stessa parola in UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 "Riferibilità metrologica"¹⁴, estraendo forse dalla definizione il termine "reference". Tuttavia, nei dizionari italiani "riferibile" può avere due significati, di cui il principale non è quello metrologico, ma quello di "far sapere ad altri..."^{15, 16}. Peraltro, "tracciabile" si trova nel "Nuove parole italiane dell'uso" (settimo volume del "Grande dizionario italiano dell'uso" del De

¹² SIPMeL. L5Q15 Raccomandazioni per il glossario nelle nuove norme ISO per i laboratori medici su taratura, "etichette" e controllo di qualità (ISO 17511, ISO 18113 e ISO 15198).

<https://www.sipmel.it/it/lineeguida/approvate/118107>

¹³ UNI CEI 70099:2008. Vocabolario Internazionale di Metrologia - Concetti fondamentali e generali e termini correlati (VIM). Data disponibilità: 27 aprile 2010

¹⁴ UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018. Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura

¹⁵ Il Nuovo De Mauro. Riferibile. <https://dizionario.internazionale.it/parola/riferibile>

¹⁶ Istituto della Enciclopedia Italiana. Riferibile. Vocabolario on line.

<https://www.treccani.it/vocabolario/riferibile/>

Mauro), è usata correntemente da almeno una quarantina d'anni soprattutto per prodotti marcati con codice a barre. Deriva non solo da un calco anglo-americano, ma anche dal verbo (lat. tractiare, der. di tractus, part. pass. di trahere «trarre») con il significato di "Segnare la traccia, soprattutto di impronte a sviluppo lineare". SIPMeL propone perciò il recupero della parola "tracciabilità", contrariamente a quanto proposto da UNI nella sua Nota Nazionale che recita "Il termine «tracciabilità» non dovrebbe essere utilizzato per designare la riferibilità metrologica", che quindi sembra una imposizione non giustificata. ISO ricorda [Nota 8] che il termine abbreviato "tracciabilità" è talvolta usato per indicare "tracciabilità metrologica" e altri concetti, come "tracciabilità del campione" o "tracciabilità del documento" o "tracciabilità dello strumento" o "tracciabilità del materiale", dove si intende la storia ("traccia") di un elemento. Pertanto, il termine completo di "tracciabilità metrologica" è preferito se esiste un rischio di confusione.

ISO 15189 assimila i metodi con risultati qualitativi a quelli con risultati quantitativi discreti.

NOTA. Risultati qualitativi e quantitativi discreti

VIM3 contiene il lemma "1.30 nominal property" che in francese viene tradotto con "propriété qualitative". La proposta di UNI 70099 è "proprietà classificatoria, proprietà qualitativa". SIPMeL ha proposto per ISO 18113 A.3.43 la versione "proprietà qualitativa, caratteristica", discostandosi dalla linea UNI, ma considerando che la stessa ISO 18113 al punto A.3.48 usa "qualitative examination" (non "nominal examination"). La proposta di VIM4 cita tra le alternative usate alla parola "examination" l'espressione "qualitative measurement".

Meno facile è definire le proprietà dei risultati quantitativi discreti¹⁷ e dei relativi metodi. Contrariamente a ISO 15189, in statistica le variabili discrete sono ritenute quantitative e assimilate alle quantitative quando si procede alle elaborazioni¹⁸, anche se si riconosce che la gestione di questi dati, come quelli ordinali, non è facile come negli altri casi.¹⁹ Nel laboratorio medico un esempio di risultati discreti è quello dei metodi per titolazione (poco citato nei libri di testo), come nel caso degli anticorpi antinucleo.²⁰ La raccomandazione CLSI in questo caso non va oltre la gestione nel controllo di qualità interno come qualitativi utilizzando la concordanza o discordanza con i valori precedenti. Formalmente, i risultati da titolazione hanno un aspetto asimmetrico che potrebbe avvalersi di una

¹⁷ Dekking, F.M., Kraaikamp, C., Lopuhaä, H.P., Meester, L.E. (2005). Discrete random variables. In: Modern Introduction to Probability and Statistics. Springer Texts in Statistics. Springer, London. https://doi.org/10.1007/1-84628-168-7_4

¹⁸ Australian Bureau of Statistics. Variables. <https://www.abs.gov.au/statistics/understanding-statistics/statistical-terms-and-concepts/variables>

¹⁹ Tanya Hoskin. Data Types. Mayo Clinic CTSA BERD. <https://www.mayo.edu/research/documents/data-types/doc-20408956>

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; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document I/LA02-A2 (ISBN 1-56238-601-8). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006

trasformazione come quella logaritmica.^{21, 22} Tuttavia, nella pratica, i risultati clinicamente significativi non sono tutti quelli dell'intervallo di misura, ma solo quelli vicini alla soglia dei positivi, per i quali l'approccio qualitativo o classificatorio è da considerare appropriato, necessario ma sufficiente^{23, 24}, come raccomandato anche nel documento SIPMeL Q16²⁵.

È significativo che ISO 15189 al punto 6.5 chieda al laboratorio la "riproducibilità" dei risultati qualitativi, anche se curiosamente nell'ambito del requisito della tracciabilità. Infatti, mentre taratura e tracciabilità si riferiscono alla caratteristica di esattezza, la riproducibilità è una forma di precisione, affiancata da ripetibilità e precisione intermedia (VIM3 voce 2.15). ISO 27877 riconosce ai risultati qualitativi (quindi anche ai quantitativi discreti e a quelli ordinali) le proprietà di "accordanza" (3.1.1 precisione interna al laboratorio, ripetibilità) e di "concordanza" (3.1.2 riproducibilità tra laboratori).²⁶

Il requisito 15189 chiede "requisiti necessari per la riproducibilità nel tempo". Letteralmente, secondo ISO 27877, sarebbe la concordanza tra laboratori misurata periodicamente. Ovvero gli esercizi di VEQ. Ma la norma non è esplicita, forse troppo criptica. Se si intendesse infatti il confronto con risultati precedenti dello stesso laboratorio, allora il termine corretto sarebbe "ripetibilità nel tempo".

ISO 15189 riconosce la possibilità che alcuni metodi non consentano la tracciabilità metrologica e propone almeno un'alternativa. Per questi metodi la clausola 6.5 sembra prevedere solo la riproducibilità (concordanza) nel tempo, ovvero gli esercizi di VEQ.

NOTA. Metodi senza tracciabilità metrologica

Come esempi di metodi senza tracciabilità metrologica ISO 15189 cita la rilevazione degli anticorpi dei globuli rossi, la valutazione della sensibilità agli antibiotici, gli esami genetici, la velocità di sedimentazione degli eritrociti, la colorazione dei marcatori in citometria a flusso e la colorazione immunoistochimica del tumore HER2.

Per i gruppi sanguigni e la sierologia degli eritrociti sono documentati i programmi di VEQ.²⁷ OMS ne fa una guida che descrive la gestione dei risultati come frequenze percentuali di concordanza.²⁸ UK NEQAS invece rappresenta frequenze semplici.²⁹

CLSI dispone di una guida per esami immunoematologici automatizzati.³⁰ CLSI I/LA33 prevede controlli e calibratori, nonché una procedura di comparazione tra metodi i cui risultati sono espressi come percentuali di concordanza. Prevede altresì una valutazione di ripetibilità con l'uso di campioni debolmente positivi, vicini al limite di rilevazione (LOD), i cui risultati sono valutati per semplice comparazione, descritta come consistenza della stessa interpretazione.

Anche per l'antibiogramma sono documentati programmi di VEQ.^{31, 32} Sono disponibili programmi VEQ anche per esami di genetica.^{33, 34, 35} Come pure per la velocità di eritrosedimentazione³⁶, la citometria a flusso³⁷ e HER2^{38, 39}

²⁷ European Committee (Partial Agreement) on Blood Transfusion (CD-P-TS). Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Strasbourg, France, 2023.
https://www.avis.it/application/files/6316/8354/3127/Blood_Guide_21st_edition.PDF

-
- ²² West RM. Best practice in statistics: The use of log transformation. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2022;59(3):162-165. doi:10.1177/00045632211050531
- ²³ Miler M. Verification of qualitative methods. EFLM Continuing Postgraduate Course in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: How To Assess the Quality of your Method? Zagreb, October 23-24, 2015. <https://www.eflm.eu/files/efcc/Zagreb-Miler.pdf>
- ²⁴ Topic E, Nikolac N, Panteghini M, et al. How to assess the quality of your analytical method?. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53(11):1707-1718. doi:10.1515/cclm-2015-0869
- ²⁵ SIPMeL. Q16 - Raccomandazioni per la stima dell'incertezza di misura nei laboratori medici (ISO 15189 e ISO 20914). 07/09/2021
- ²⁶ UNI ISO/TR 27877:2021. Analisi statistica per valutare la precisione dei metodi di misurazione binari e i loro risultati
- ²⁷ European Committee (Partial Agreement) on Blood Transfusion (CD-P-TS). Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Strasbourg, France, 2023. https://www.avis.it/application/files/6316/8354/3127/Blood_Guide_21st_edition.PDF
- ²⁸ WHO. External quality assessment of transfusion laboratory practice: guidelines on establishing an EQA Scheme in blood group serology. World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland, 2004 <https://www.who.int/publications/i/item/9241591250>
- ²⁹ UK NEQAS Blood Transfusion Laboratory Practice. ABO Titration Scheme. UK NEQAS; Watford WD18 0WP, UK, 2024. <https://www.ukneqash.org/bt1p.php#abot>
- ³⁰ CLSI. Validation of Automated Systems for Immunohematological Testing Before Implementation; Approved Guideline. CLSI document I/LA33-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009
- ³¹ WHO. External Quality Assessment (EQA) provided for bacterial identification and Antimicrobial Susceptibility Testing (AST). <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imr-details/4976>
- ³² 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/en/publications-data/external-quality-assessment-eqa-performance-laboratories-participating-european-0>
- ³³ Istituto Superiore di Sanità. Italian External Quality Assessment of Genetic Testing. Roma (Italy), 2022. https://www.iss.it/en/malattie-rare/-/asset_publisher/9PBa3dbogbRa/content/il-ceq-istruzioni
- ³⁴ Payne DA, Russomando G, Linder MW, et al. External quality assessment (EQA) and alternative assessment procedures (AAPs) in molecular diagnostics: findings of an international survey. *Clin Chem Lab Med*. 2020;59(2):301-306. Published 2020 May 8. doi:10.1515/cclm-2020-0101
- ³⁵ EMQN. Laboratory Performance Criteria. EMQN Manchester UK. <https://www.emqn.org/participating-in-eqa/laboratory-performance-criteria/>
- ³⁶ UK NEQAS for General Haematology. Erythrocyte Sedimentation Rate (ES surveys). UK NEQAS; Watford WD18 0WP, UK, 2024. <https://www.ukneqash.org/gh.php#esr>
- ³⁷ UK NEQAS. Flow Cytometry Programmes. UK NEQAS; Watford WD18 0WP, UK, 2024. <https://www.ukneqasli.co.uk/eqa-pt-programmes/flow-cytometry-programmes/>
- ³⁸ Terrenato I, Arena V, Pizzamiglio S, Pennacchia I, Perracchio L, Buglioni S, Ercolani C, Sperati F, Costarelli L, Bonanno E, Baldini D, Candia S, Crescenzi A, Dal Mas A, Di Cristofano C, Gomes V, Grillo LR, Pasquini P, Pericoli MN, Ramieri MT, Di Stefano D, Ruco L, Scarpino S, Vitolo D, d'Amati G, Paradiso A, Verderio P, Mottolese M. External Quality Assessment (EQA) program for

ISO 15189 chiede al punto 6.5.2 procedure per la taratura delle apparecchiature che influiscono direttamente o indirettamente sui risultati degli esami. Le procedure devono contenere condizioni d'uso e istruzioni del fabbricante per la taratura, la registrazione della tracciabilità metrologica, la verifica dell'accuratezza di misurazione richiesta e del funzionamento del sistema di misurazione a intervalli specificati, la registrazione dello stato di taratura e della data di ritaratura, l'aggiornamento e la registrazione di eventuali fattori di correzione al momento della ritaratura, la gestione delle situazioni in cui la taratura è fuori controllo.

NOTA. Verifica di accuratezza per la taratura

Il punto 6.5.2 chiede per la taratura sia verificata l'accuratezza richiesta per il metodo di misura. La definizione 3.18 (accuratezza della misura, accuratezza) è "grado di concordanza tra il valore di una grandezza misurata e il valore della grandezza vera di un misurando", aggiungendo nella Nota 2 alla voce che il termine "accuratezza di misura" non deve essere utilizzato per l'esattezza e il termine "precisione" non deve essere utilizzato per "accuratezza", che tuttavia è correlata a entrambi i concetti. Ne risulta che la voce 3.18 comprende sia 3.29 "esattezza" che una voce mancante (nonostante sia usata ben 6 volte nel capitolo 3) che sarebbe "precisione", voce 2.15 di VIM3. Tutt'e due da acquisire prima della taratura.

Inoltre, il collegamento tra taratura, accuratezza, esattezza e precisione conferma l'opportunità di gestire insieme questi temi strumentali.

Al punto 6.5.3 ISO 15189 chiede la tracciabilità metrologica dei risultati di misura mediante una catena documentata e ininterrotta di tarature, ciascuna delle quali contribuisce all'incertezza di misura, collegandole a un riferimento appropriato. Le informazioni sulla riferibilità a un materiale di riferimento di ordine superiore o a una procedura di riferimento possono essere fornite dal fabbricante, ma sono accettabili solo se il sistema d'esame e le procedure di taratura del produttore vengono utilizzati senza modifiche.

I risultati delle misurazioni devono essere riconducibili al più alto livello possibile di tracciabilità e al Sistema internazionale di unità di misura (SI) mediante taratura fornita da un laboratorio competente oppure valori certificati di materiali di riferimento certificati forniti da un produttore competente con dichiarata riferibilità metrologica al SI. I laboratori di taratura che soddisfano i requisiti della norma ISO/IEC 17025 sono considerati competenti per l'esecuzione delle tarature. I produttori di materiali di

the preanalytical and analytical immunohistochemical determination of HER2 in breast cancer: an experience on a regional scale. J Exp Clin Cancer Res. 2013 Aug 21;32(1):58. doi: 10.1186/1756-9966-32-58. PMID: 23965490; PMCID: PMC3766003.

³⁹ UK NEQAS Immunocytochemistry & In-Situ Hybridisation. Breast HER2 ISH (Interpretive and Technical). UK NEQAS; Watford WD18 0WP, UK, 2024.
<https://ukneqas.org.uk/programmes/result/?programme=breast-her2-ish-%28interpretive-and-technical%29>

riferimento che soddisfano i requisiti della norma ISO 17034⁴⁰ sono considerati competenti. I materiali di riferimento certificati che soddisfano i requisiti della norma ISO 15194⁴¹ sono considerati idonei.

NOTA. Laboratori di riferimento

ISO 17025 basta per i laboratori che fanno tarature, ma i laboratori che certificano materiali di riferimento devono essere conformi a ISO 15195⁴², norma per i laboratori che usano metodi di riferimento. I laboratori di riferimento non vanno confusi con i laboratori di referenza, che eseguono esami per conto dei laboratori richiedenti (ISO 15189 punto 6.8.2).

Qualora non sia possibile fornire la tracciabilità con le metodologie sopra citate, devono essere utilizzati altri mezzi, tra cui, ad esempio, risultati di procedure di misurazione di riferimento, metodi specificati o norme di consenso garantiti da un'adeguata comparazione, misurazione del calibratore con un'altra procedura. La norma ISO 17511 fornisce ulteriori informazioni su come gestire i compromessi nella tracciabilità metrologica delle misure.

NOTA. Compromessi nella tracciabilità metrologica

ISO 17511 contiene i requisiti per stabilire la riferibilità metrologica dei valori assegnati a calibratori, materiali di controllo per l'esattezza e campioni umani. Sostituisce ISO 18153:2003 incorporando da questa il concetto di "gerarchie di taratura". Aggiunge inoltre l'estensione della riferibilità ai campioni umani, l'aggiornamento al Vocabolario di metrologia, i requisiti per fabbricanti di dispositivi medici per diagnostica in vitro (IVD MD), l'armonizzazione internazionale di ISO 21151.⁴³

ISO 21151⁴⁴ contiene i requisiti per i protocolli internazionali di armonizzazione che stabiliscono la riferibilità metrologica dei valori assegnati ai calibratori e ai campioni umani quando i riferimenti di ordine superiore sono tecnicamente difficili e richiedono quindi un protocollo amministrato da un organismo internazionale, ovvero il caso 5.6 di ISO 17511.

ISO 17511 al punto 4.5.8 descrive le alternative ai materiali di riferimento, ossia includono pannelli e/o miscele di singoli campioni umani, campioni integrati o "addizionati" preparati in matrici naturali o artificiali, o altri materiali adatti. Per indicazioni sulla selezione appropriata del pannello di campioni umani da utilizzare in una gerarchia di calibrazione, vedere CLSI EP09-A3, EP14-A3 e EP30-A. Questo è uno dei casi in cui una norma ISO richiama documenti CLSI. ISO 15189 (con una sola eccezione) non ha voluto avvalersi di questa possibilità.

Per gli esami genetici, secondo ISO 15189 deve essere stabilita la tracciabilità rispetto alle sequenze genetiche di riferimento.

NOTA. Tracciabilità per gli esami di genomica

CLSI MM01 è la guida su esami molecolari per la genetica ereditaria e identificazione dei campioni. Pubblicata nel 2023.⁴⁵

⁴² UNI EN ISO 15195:2019. Medicina di laboratorio - Requisiti per la competenza dei laboratori di taratura che utilizzano procedure di misura di riferimento

⁴³ Pradella M. Taratura, armonizzazione e standardizzazione nelle nuove ISO 17511 e ISO 21151. La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio 2020 Giugno;16(2):129-31. DOI: 10.23736/S1825-859X.19.00034-3

⁴⁵ CLSI. Molecular Testing for Heritable Genetics and Specimen Identification. 4th ed. CLSI guideline

MM01 definisce una variante del numero di copie (CNV) arbitrariamente come un segmento di DNA di almeno 1 kb che differisce in numero di copie da un genoma di riferimento rappresentativo. Per definire le varianti, è essenziale includere la sequenza e la versione di riferimento. Il riferimento del genoma umano è mantenuto dal Consorzio internazionale di riferimento del genoma (GRC), che include il National Center for Biotechnology Information (NCBI) come uno dei suoi membri. L'ultima versione importante è la GRCh38, che comprende diversi tipi di revisioni o "patch".

Le varianti del DNA mitocondriale sono descritte con le stesse regole delle varianti dei cromosomi nucleari lineari, ad eccezione del fatto che il prefisso "g." è sostituito da "mt.", che sta per "sequenza di riferimento del DNA mitocondriale". La sequenza di riferimento del mtDNA e un compendio di polimorfismi e varianti del mtDNA umano sono disponibili all'indirizzo <http://www.mitomap.org/MITOMAP>. Come per il genoma nucleare, è necessario indicare la sequenza mitocondriale di riferimento utilizzata. Tradizionalmente, come sequenza mitocondriale di riferimento è stata utilizzata la sequenza di riferimento di Cambridge rivista, derivata da una donna di origine europea. Tuttavia, alcuni sostengono l'utilizzo della sequenza di riferimento Sapiens ricostruita, che rappresenta una ricostruzione del genoma mitocondriale ancestrale di Eva.

Ad esempio, l'elettroforesi capillare utilizza marcatori marcati in modo fluorescente che vengono incorporati in modo specifico direttamente nel bersaglio. Il programma informatico di analisi dei frammenti calcola le dimensioni dei frammenti. Può essere utilizzata per assegnare un genotipo, utilizzando un database di riferimento memorizzato.

Similmente, la reazione a catena della polimerasi digitale in gocce (ddPCR) è impostata come una PCR in doppio, con una coppia primer-sonda mirata al locus bersaglio specifico e una seconda coppia primer-sonda mirata a un gene di riferimento standard. Le due sonde sono marcate con fluorofori diversi e la fluorescenza viene rilevata solo quando è presente il prodotto di amplificazione corrispondente

Nel sequenziamento di nuova generazione (NGS) le letture vengono confrontate con il genoma umano di riferimento per identificare le varianti. In primo luogo, le varianti devono essere valutate come falsi positivi o veri positivi. Quindi, molte fonti di dati (ad esempio, bioinformatica, letteratura pubblicata, database delle varianti, frequenze alleliche) vengono combinate per valutare il significato di ciascuna variante. A molte varianti viene attribuita l'etichetta di "variante di significato sconosciuto (VUS)".

Nelle registrazioni di laboratorio dei risultati degli esami molecolari e nei Rapporti dei risultati per gli esami molecolari vanno riportati riferimenti, standard e altri valori attesi di controlli noti, il numero di accesso alla banca dati e il numero di versione della sequenza di riferimento utilizzata.

MM01. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2023

⁴³ Pradella M. Taratura, armonizzazione e standardizzazione nelle nuove ISO 17511 e ISO 21151. La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio 2020 Giugno;16(2):129-31. DOI: 10.23736/S1825-859X.19.00034-3

⁴⁴ UNI ISO 21151:2021. Dispositivi medico-diagnostici in vitro - Requisiti per i protocolli di armonizzazione internazionali che stabiliscono la tracciabilità metrologica dei valori assegnati ai calibratori e ai campioni umani

⁴⁵ CLSI. Molecular Testing for Heritable Genetics and Specimen Identification. 4th ed. CLSI guideline MM01. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2023

CLSI MM09 riguarda gli esami genetici e genomici sull'uomo con metodi di sequenziamento dell'acido nucleico tradizionali e ad alto rendimento ed è stato revisionato nel 2023⁴⁶

Nel Capitolo 3 si trovano i punti significativi, come 3.2 Progettazione, sviluppo e ottimizzazione dei metodi, 3.3 validazione, rivalidazione e verifica dei metodi, 3.4 Conferma dei risultati, 3.5 gestione della qualità, 3.6 sull'infrastruttura bioinformatica. Affiancati da appendici su sequenziamento di nuova generazione (NGS), progettazione e ottimizzazione dell'esame, esempi di applicazioni somatiche, interpretazione e reportistica.

MM09 inserisce nella definizione di accuratezza (di una misura) la precisazione che nell'analisi delle sequenze di acidi nucleici, l'accuratezza complessiva si riferisce alla vicinanza dell'accordo tra il risultato di un esame (cioè la sequenza assemblata derivata) e il valore di riferimento accettato (cioè la sequenza vera).

Possiamo sottolineare che per MM09 l'esame genetico è una misura, a prescindere dalla forma dei suoi risultati.

Per MM09 il materiale di riferimento (termine generico) può essere usato per un solo scopo tra taratura di un sistema di misurazione, valutazione di una procedura di misurazione, assegnazione di valori ad altri materiali o controllo di qualità.

In progettazione, sviluppo e ottimizzazione dell'esame genetico si prevede assemblaggio di campioni di riferimento da utilizzare per l'ottimizzazione e la successiva validazione, che devono rappresentare tutti i tipi accettati dal laboratorio, nonché tutti i tipi di varianti clinicamente rilevanti, comprese le varianti patogene comuni.

Per la validazione metrologica basata sui metodi, ad esempio, un esame interroga 100 000 coppie di basi (bp). Lo sviluppatore utilizza un campione di riferimento ben caratterizzato che presenta 200 varianti all'interno di questa regione e osserva cinque chiamate falsi positivi. La specificità calcolata con la formula tradizionale è del 99,995% (99 995 / 100 000).

La specificità dell'esame (frazione dei veri negativi su tutti i negativi, compresi i falsi positivi, utilizzando le basi di riferimento come veri negativi, esprime la capacità di chiamare correttamente le basi di riferimento nell'intera regione. - Per la validazione basata sui metodi sono necessari campioni di riferimento complessi, poiché i campioni di riferimento tradizionali hanno un numero limitato di varianti o basi di riferimento validate. Ad esempio, per i pannelli multigenici per i disturbi ereditari, i campioni di riferimento comuni includono linee cellulari che sono state ben caratterizzate in gran parte dell'esoma (ad esempio, NA12878 o equivalente).

La convalida specifica del contenuto verifica gli aspetti specifici dei geni e delle patologie. I campioni di pazienti precedentemente esaminati sono una fonte di campioni specifici per il contenuto. Tuttavia, per evitare di sovrastimare le prestazioni del metodo, i laboratori dovrebbero includere anche campioni di pazienti che non sono stati precedentemente analizzati. Per lo stesso motivo, devono essere inclusi altri campioni esaminati con un metodo di confronto indipendente o con un metodo di riferimento. Si devono utilizzare campioni aggiuntivi (ad esempio, linee cellulari derivate da campioni di pazienti, campioni artificiali, campioni di riferimento disponibili in

⁴⁶ CLSI. Human Genetic and Genomic Testing Using Traditional and High-Throughput Nucleic Acid Sequencing Methods. 3rd ed. CLSI guideline MM09. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023

commercio). Ad esempio, i campioni devono rappresentare adeguatamente le varianti di sequenza clinicamente rilevanti e i contesti genomici che l'esame è progettato per rilevare. Il mosaicismismo somatico è comune per un gene di un pannello multigenico per una malattia ereditaria. In questo caso, il laboratorio deve stabilire il livello minimo di mosaicismismo che può essere rilevato in modo affidabile e procurarsi campioni di riferimento con il livello di mosaicismismo caratterizzato o creare campioni mescolando eterozigoti e omozigoti. Anche le regioni tecnicamente difficili (ad esempio, le regioni ad alta omologia di sequenza) devono essere prese in considerazione durante la validazione. Sono pubblicamente disponibili nuovi materiali di riferimento che includono sequenze di confronto ed elenchi di varianti per geni altamente omologhi e di rilevanza medica.

Quando un componente del metodo non è cambiato in modo significativo, la documentazione dell'equivalenza può essere accettabile al posto della validazione completa. Ad esempio, in caso di modifica di un reagente, di un'apparecchiatura o di un componente informatico, la ripetizione con un numero sufficiente di campioni clinici analizzati in precedenza o di campioni di riferimento ben caratterizzati (ad esempio, NA12878 [o equivalente]) può stabilire l'equivalenza. Questo approccio può essere utilizzato anche quando il laboratorio si trasferisce fisicamente o utilizza un reagente di un nuovo fornitore.

La validazione delle componenti bioinformatiche, come i processi di esame in laboratorio, deve basarsi principalmente su campioni clinici. I laboratori possono integrare (ma non sostituire del tutto) i campioni di validazione con campioni generati "in silico" (simulazioni informatiche) o con campioni di riferimento con valori noti.

Per la fase bioinformatica di sequenziamento di nuova generazione (NGS), dopo che i dati di sequenziamento sono stati disaggregati, i gruppi di letture possono essere combinati e mappati su un genoma di riferimento. Quando si sceglie un genoma di riferimento per l'allineamento, i laboratori devono ricordare che non tutti gli strumenti e le banche dati a valle sono compatibili con tutti i genomi di riferimento. La maggior parte degli strumenti attualmente si rivolge all'assemblaggio di riferimento Genome Reference Consortium Human 37 (cioè GRCh37, noto anche come hg37), mentre alcuni migrano verso l'assemblaggio di riferimento Genome Reference Consortium Human 38 (cioè GRCh38, noto anche come hg38). MM09 fornisce gli indirizzi per consultare queste fonti.

Dopo che le letture sono state mappate su un genoma di riferimento appropriato, un tipico flusso di lavoro NGS germinale o somatico utilizza uno o più chiamanti di varianti. La concordanza tra i singoli strumenti può essere inferiore al 100%, anche quando vengono elaborati gli stessi dati. Pertanto, alcuni laboratori utilizzano più algoritmi di chiamata per classe di varianti e applicano un consenso finale o una fase di arbitrato per risolvere le discrepanze.

Durante la fase di progettazione è necessario caratterizzare i tipi di varianti patogene. Se un gene presenta varianti patogene ricorrenti lo sviluppatore potrebbe dover utilizzare campioni clinici o di riferimento specifici, oltre ai campioni di riferimento generali.

Nel caso della rilevazione del mosaicismismo somatico per patologie tipicamente ereditarie, potrebbe essere necessaria una maggiore profondità di lettura per il sequenziamento, a seconda del livello di mosaicismismo da rilevare. I materiali di riferimento specifici devono essere aggiunti alla validazione.

È importante selezionare campioni di riferimento durante la fase di progettazione, perché possono essere utilizzati per valutare le prestazioni. MM09 fornisce una scheda nel foglio di lavoro sulla progettazione per le fonti di materiali di riferimento comuni. Inoltre, sovente i laboratori usano

come materiali di riferimento campioni anonimizzati di pazienti. Il registro degli esami genetici di CBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/>) è una risorsa utile per individuare le potenziali fonti di materiali di riferimento.

Per fare la validazione del metodo, molti sviluppatori usano almeno un campione di riferimento completamente sequenziato con un gran numero di chiamate veri positivi e veri negativi. Ad esempio, i campioni di riferimento NA12878 (caucasico) (o equivalente), NA24385 (ebreo ashkenazita) (o equivalente) e NA24631 (cinese Han) (o equivalente). Il campione di riferimento NA24385 (o equivalente) è particolarmente adatto per l'accuratezza dei geni ad alta omologia di sequenza.

Per gli studi di precisione, si devono valutare campioni clinici provenienti da diversi tipi di campioni e tessuti, nonché diversi tipi di varianti e frequenze di mutazione previste. Servono anche includere campioni impegnativi con un contenuto tumorale minimo accettabile, nonché campioni con un basso apporto di acido nucleico ma che sono al di sopra della soglia. Quando non sono disponibili campioni clinici contenenti alterazioni genomiche rare, gli sviluppatori dei test possono utilizzare campioni di riferimento artificiali (ad esempio, linee cellulari), a condizione che il tipo di campione artificiale sia stato caratterizzato funzionalmente come equivalente a un campione clinico.

Per stabilire le metriche preliminari di qualità (come il limite del bianco), il laboratorio deve sequenziare più campioni di riferimento noti. Le linee cellulari di riferimento altamente caratterizzate sono disponibili pubblicamente (scheda F nel foglio di lavoro Progettazione del contenuto del test).

Per elaborare i dati di sequenziamento grezzi NGS si possono utilizzare due algoritmi, entrambi usando libreria di riferimento di alleli HLA. Alcuni pacchetti software analizzano i risultati utilizzando entrambi gli approcci e li confrontano internamente per verificare la concordanza.

Infine, l'appendice D del documento CLSI MM09 al punto D4.6 chiede che con il risultato dell'esame si fornisca una sintesi della metodologia, delle limitazioni e delle raccomandazioni per la consulenza genetica. La sezione sulla metodologia deve includere informazioni sulla tracciabilità, come la versione del flusso informatico (pipeline) e la versione del genoma di riferimento utilizzato.

La guida CLSI MM17- fornisce raccomandazioni per la verifica e la validazione dei metodi multicanale (multiplex), oltre a una rassegna dei diversi tipi di materiali di riferimento biologici e sintetici.⁴⁷ Descrive processi di validazione e verifica per i metodi multicanale degli acidi nucleici, selezione del metodo, valutazione del campione e del reagente, procedura di esame, protocolli di validazione e verifica, validazione di un metodo sviluppato in laboratorio, validazione di un metodo diagnostico in vitro modificato, verifica di un metodo diagnostico in vitro. Aggiunge appendici molto utili come tecnologie di amplificazione del bersaglio, materiali di riferimento per DNA genomico da linea cellulare, validazione di esami multicanale sugli acidi nucleici sviluppati in laboratorio, esempio per la validazione di esami diagnostici in vitro multicanale modificati, esempio per la verifica di metodi diagnostici in vitro multicanale.

⁴⁷ CLSI. Validation and Verification of Multiplex Nucleic Acid Assays. 2nd ed. CLSI guideline MM17. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

Anche per MM17 il materiale di riferimento (termine generico) può essere usato per un solo scopo tra taratura di un sistema di misurazione, valutazione di una procedura di misurazione, assegnazione di valori ad altri materiali o controllo di qualità.

I materiali di riferimento (RM) sono prodotti con metodi diversi e sottoposti a vari tipi di caratterizzazione da parte del produttore. Sono disponibili guide per i produttori e gli utilizzatori di RM. Altre informazioni nei documenti CLSI MM01 1 e MM03

I CRM, gli SRM e gli standard internazionali possono essere costosi e spesso sono distribuiti in piccole quantità. Altri RM, come il gDNA isolato da linee cellulari, campioni di pazienti residui, campioni microbici, controlli sintetici e prodotti di amplificazione del genoma intero, sono spesso prodotti in quantità maggiori, quindi sebbene siano meno caratterizzati, possono essere utilizzati quotidianamente come materiali QC.

Quando si utilizza materiale genomico, occorre considerare la ploidia e la possibilità di problemi quali il riarrangiamento e la delezione dei marcatori cromosomici. Per esempio, le cellule immortalizzate in una coltura possono avere diversi gradi di poliploidia. Per gli agenti infettivi, la linea cellulare può avere riarrangiamenti genomici con legame artificiali e generare falsi positivi.

I metodi multicanale per gli acidi nucleici presentano complessità non riscontrabili nei metodi più semplici e la validazione e la verifica dei primi possono essere impegnative. A causa della gamma di tecnologie multiplex, sono necessari più tipi di RM e metodi per utilizzarle.

Sono disponibili alcuni materiali di riferimento certificati e materiali di riferimento standard. Sono caratterizzati da una procedura metrologicamente valida per una o più proprietà specificate e sono accompagnati da un certificato che descrive il valore della proprietà, la sua incertezza e una dichiarazione di tracciabilità metrologica. I materiali disponibili includono gDNA umano, DNA sintetico, plasmidi di DNA mitocondriale contenenti DNA umano e DNA genomico batterico e virale.

Poiché il sangue di pazienti con mutazioni rare non è né stabile né facilmente disponibile, i campioni di DNA genomico da linee cellulari sono importanti RM. Sono linee cellulari umane immortalizzate, DNA genomico purificato, colture microbiche e DNA genomico batterico.

Sono disponibili materiali genomici multipli e miscele di organismi per gli esami sulle malattie infettive. I materiali sono generalmente inattivati termicamente per renderli non infettivi e sono confezionati per l'uso in concentrazioni che simulano un campione del paziente.

È disponibile anche l'RNA genomico totale in estratti da vari tessuti. L'RNA genomico totale è utile per ottimizzare e risolvere i problemi della PCR a trascrizione inversa (RT-PCR) sia in tempo reale che convenzionale, nonché per determinare le curve standard e le efficienze di amplificazione della RT-PCR in tempo reale.

I laboratori medici possono anche utilizzare il DNA derivato da campioni di pazienti rimanenti. I requisiti normativi applicabili in materia di ricerca su soggetti umani devono essere rispettati.

I materiali di riferimento non genomici sono sintetici, ricombinanti, ingegnerizzati o costruiti artificialmente. Sono spesso composti da plasmidi o oligonucleotidi sintetizzati, stabili e facili da usare, e sono particolarmente adatti per i saggi multicanale. Possono anche essere inseriti nel gDNA.

I materiali di riferimento non genomici possono contenere un intero gene, tutti i segmenti genici significativi correlati alla malattia o solo un segmento genico specifico. Servono per processi

specifici, come l'amplificazione o la rilevazione del DNA, oppure per il monitoraggio di più processi, comprese le fasi di estrazione e purificazione dell'acido nucleico. I segmenti di acido nucleico incapsulati, legati e/o matrice-complessi (ad esempio, l'acido nucleico amplificabile recuperato dai processi di estrazione dell'acido nucleico del paziente) possono essere utilizzati per monitorare l'intero processo di esame.

Gli ampliconi sono preparati mediante trascrizione in vitro di un adeguato modello di DNA. I metodi di controllo di qualità utilizzati dai produttori possano essere proibitivi per i costi o al di fuori delle capacità di molti laboratori, ma sono necessarie alcune pratiche di base per valutare la coerenza da lotto a lotto dei controlli sviluppati in laboratorio. Può essere utile il documento CLSI EP10.

Per creare un controllo sintetico che assomigli al DNA genomico umano, sono stati introdotti in linee cellulari originali geni contenenti sequenze di varianti di interesse utilizzando tecniche di mutagenesi sito-diretta e di ricombinazione omologa mirata. Il sistema CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) è stato utilizzato per modificare i genomi di linee cellulari umane. Queste linee cellulari e il loro DNA possono essere utilizzati come materiali di riferimento.

I controlli multicanale possono essere creati a partire da ampliconi PCR.

Abbiamo anche acido nucleico confezionato con fagi e proteine di fagi. Sono molecole di RNA bersaglio incapsulate in un guscio proteico protettivo costituito da proteine di rivestimento ingegnerizzate del batteriofago MS2. I complessi RNA-proteina purificati che ne derivano sono protetti dalla degradazione delle RNasi e sono stabili in soluzione o in una matrice umana scelta a varie temperature e per vari tempi di incubazione. Possono essere utilizzati direttamente come controlli positivi sia interni che esterni, imitando i campioni dei pazienti. Ad esempio, l'RNA impacchettato è stato utilizzato nei sistemi multicanale come controllo positivo interno esogeno per rilevare il virus dell'influenza aviaria.

MM17 cita cinque genomi disponibili pubblicamente caratterizzati utilizzando una varietà di piattaforme di sequenziamento massivo parallelo (NGS) e disponibili come materiali di riferimento da diverse fonti. Riferisce inoltre di più di 400 materiali di riferimento di DNA genomico per una serie di patologie genetiche (elencati nella Tabella B1 in appendice).

Il documento CLSI MM20 edizione 2012 si occupa di Gestione della qualità per gli esami genetici molecolari.⁴⁸

Secondo MM20 il mantenimento di banche dati di varianti di sequenza è importante per gestire i continui aggiornamenti delle informazioni genetiche man mano che vengono documentate nuove scoperte o associazioni fenotipiche. La Human Genome Variation Society ha formulato raccomandazioni per la nomenclatura dei geni e delle mutazioni e per i database specifici dei loci. Il database delle sequenze di riferimento (RefSeq), gestito dal National Center for Biotechnology Information, fornisce un catalogo di sequenze codificanti umane di consenso, che viene regolarmente aggiornato ed è stato utilizzato come riferimento comune per lo studio e la segnalazione dei risultati delle sequenze. Per lo sviluppo di procedure di convalida/verifica devono

⁴⁸ CLSI. Quality Management for Molecular Genetic Testing; Approved Guideline. CLSI document MM20-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

essere identificate le fonti di materiali di riferimento, come pure per validazione e verifica dei metodi servono materiali di taratura e altri materiali di riferimento necessari per le procedure di analisi.

È disponibile, infine, il document CLSI MM21 su micromatrici (microarray) del numero di copie genomiche per applicazioni di genetica costituzionale e oncologia, edizione 2015.⁴⁹ Contiene paragrafi su validazione, verifica ed esame di micromatrici genomiche, selezione di una metodologia, selezione dei campioni di microarray, interpretazione dei risultati.

I metodi si differenziano principalmente per il tipo di sonde, polimorfiche (genotipizzazione SNP), non polimorfiche (oligonucleotidi aCGH) o una combinazione di questi due tipi. Le piattaforme aCGH standard utilizzano un approccio di riferimento interno, che richiede la coibridazione del DNA del paziente e del DNA di controllo, marcati indipendentemente con coloranti fluorescenti diversi prima della loro ibridazione. Per la maggior parte degli SNP, viene utilizzato un approccio di riferimento esterno in cui solo il DNA del paziente viene marcato e ibridato. I valori di riferimento sono ottenuti da un campione abbinato al paziente, da un campione di riferimento esterno (singolo o da miscela) o da una libreria di riferimento informatica (in silico) di campioni normali.

A seconda dei requisiti della piattaforma, il DNA di riferimento può provenire da un singolo individuo o da una miscela di individui e può essere applicato in silico o come ibridazione competitiva diretta. La qualità dei dati è ottimizzata se il DNA di riferimento corrisponde il più possibile al DNA del paziente per quanto riguarda il tipo di tessuto, la qualità del campione e le condizioni dell'esame. Tutte le tecnologie su matrice effettuano confronti tra il campione di interesse e un riferimento (interno o esterno). In sostanza, ogni sonda di una matrice funziona come un controllo interno.

Per i metodi qualitativi, la tracciabilità può essere dimostrata mediante prove su materiale noto o su campioni precedenti sufficienti a dimostrare un'identificazione coerente e, se del caso, l'intensità della reazione.

NOTA. Tracciabilità per risultati qualitativi

ISO 15189 sul tema della tracciabilità per i risultati come positivo, negativo, presente, assente si esprime in modo secco, laconico, ma chiaro. Non si può fare a meno della tracciabilità, da ottenersi direttamente da materiali di riferimento, ma anche se necessario da campioni precedenti, senza dire come a loro volta sono caratterizzati. Inoltre, prevede che si tenga in considerazione l'intensità del segnale, ovvero la misura quantitativa.

CLSI EP12 tratta la valutazione delle prestazioni dell'esame qualitativo, a risultato binario.⁵⁰

Si occupa di parametri qualitativi e di raggruppamento, sottocategorie di esami qualitativi con

⁴⁹ CLSI. Genomic Copy Number Microarrays for Constitutional Genetic and Oncology Applications. 1st ed. CLSI guideline MM21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

⁵⁰ CLSI. Evaluation of Qualitative, Binary Output Examination Performance. 3rd ed. CLSI guideline EP12. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023.

uscita binaria, sviluppo di esami qualitativi che utilizzano un confronto di valore soglia con una risposta continua interna, sviluppo di esami qualitativi con rilevamento di costituenti, stabilità dei materiali reagenti usati negli esami qualitativi, validazione di un esame qualitativo con uscita binaria, studi di precisione, valutazione delle prestazioni cliniche, sostanze interferenti per gli esami qualitativi, dichiarazioni di prestazione, verifica della precisione, prestazioni cliniche o accordo, stabilità del reagente, cambio del lotto del reagente. Tutto appoggiato da diverse appendici di esempi pratici: esempi di esame, collegamento tra la distribuzione della risposta continua interna e i modelli Probit o Logit, esami binari qualitativi a lettura visiva, valutazione della precisione del sequenziamento di nuova generazione (NGS), determinazione del limite inferiore di rilevamento per gli esami qualitativi basati sui metodi di reazione a catena della polimerasi (PCR), studi di precisione, studi di precisione sugli osservatori, punteggio Wilson per il calcolo degli intervalli di confidenza, esempi di analisi delle prestazioni cliniche, esempio di reazione a catena della polimerasi in tempo reale per gli enterococchi resistenti alla vancomicina.

*Gli esami binari qualitativi possono essere distinti con due criteri: uso previsto e progettazione della procedura di esame. Secondo l'utilizzo previsto ci sono esami per determinare la condizione del paziente, ad esempio gravidanza, vaccinazione o infezione da virus, droghe d'abuso oltre un livello specificato e cancro. Altri esami di questo tipo servono per determinare se un campione contiene un costituente bersaglio, ad esempio microbi come *Trichomonas vaginalis* e il coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave.*

Secondo la procedura di esame, invece, si riconoscono esami che utilizzano un valore limite su un'unica scala di risposta continua interna (ICR), esami che utilizzano un algoritmo decisionale in grado di utilizzare più ICR e/o dati categorici, esami letti visivamente dall'utente senza ICR, come la comparsa di un precipitato in una provetta per campione o di una striscia colorata su una striscia reattiva immersa in un campione.

EP12 usa il termine "risposta continua interna (ICR) per l'indicazione (chiamata anche segnale) fornita da uno strumento in seguito all'esame di un campione, che in alcuni esami qualitativi, viene confrontata con un valore di soglia per produrre il risultato binario. EP12 descrive come per la verifica di esattezza molti esami qualitativi confrontano l'ICR di un campione con materiale con un ICR al valore soglia. Il materiale al valore soglia è metrologicamente riconducibile a un materiale di riferimento interno del produttore o a un materiale di riferimento esterno. Il valore assegnato può essere utilizzato per tarare il sistema o per garantire che mantenga la sua esattezza.

Un numero significativo e crescente di esami qualitativi viene eseguito mediante PCR. La misurazione delle prestazioni dell'esame richiede l'uso di campioni per i quali sia noto il numero medio di copie della sequenza di DNA bersaglio per volume di campione. La preparazione di campioni a basse concentrazioni può essere difficile perché il materiale di riferimento è spesso disponibile solo in concentrazioni elevate (ad esempio, 10^6 copie/mL). Le molteplici diluizioni seriali necessarie per ridurre la concentrazione di sei ordini di grandezza o più possono introdurre errori inevitabili. In alternativa, i campioni a concentrazione inferiore possono essere misurati con una procedura di riferimento come la PCR digitale.

Un esame qualitativo letto visivamente è quello in cui la categorizzazione viene effettuata dall'osservazione dell'utente piuttosto che dalla strumentazione. Tali esami non hanno una risposta continua interna (ICR). Tuttavia, la risposta "sì o no" può simulare un limite su un

misurando quantitativo. Esempi di esami con lettura visiva sono le cartucce per test di gravidanza, lo screening delle droghe nelle urine e la barretta (flusso laterale) per gli anticorpi dell'epatite C. La variabilità causata dall'interpretazione dell'utente può essere ampia, dipende fortemente dalla presenza di un precipitato o di una linea colorata, influenzate da condizioni di luce, colore di sfondo (per contrasto) e giudizio individuale o acuità visiva.

Gli esami qualitativi letti visivamente possono utilizzare una procedura di misurazione quantitativa esistente per creare campioni di prova con valori noti utilizzando materiali di riferimento. Questa fase di sviluppo non è trasparente al laboratorio, ma solo al fabbricante, da cui va ottenuta l'evidenza di conformità al requisito della norma. Al laboratorio resta però la possibilità di stimare ripetibilità e riproducibilità in base alle frequenze di accordo tra risultati (Appendice G di CLSI EP12).

L'esempio in Appendice D di EP12 riguarda la ricerca della mutazione nell'esone 2 del gene KRAS, posizione c.35G.T. Si calcolerà la percentuale di frequenza allelica della variante mutazionale (VAF) e si confronterà il risultato con un valore limite del 15% VAF. I valori VAF non vengono comunicati all'utente finale, ma sono a disposizione del produttore. Lo studio è per determinare la variabilità totale del sistema per stimare il valore intralaboratorio. L'analisi delle componenti di varianza dei VAF viene eseguita per stimare le componenti di precisione (SD) per ciascuna fonte di variazione (strumento, operatore, strumento • operatore, giorno [strumento, operatore], replica) e totale. La dispersione (variabilità) tra le osservazioni è inferiore nei campioni VAF di livello inferiore e aumenta per i campioni VAF di livello superiore. Lo studio richiede quindi una stretta cooperazione tra laboratorio e fabbricante.

Requisiti di processo (ISO 15189 capitolo 7)

Processi d'esame (clausola 7.3)

ISO 15189 chiede di selezionare e utilizzare metodi di esame validati per l'uso previsto, ovvero l'accuratezza clinica dell'esame per il paziente. I metodi preferiti sono quelli specificati nelle istruzioni per l'uso dei dispositivi medico-diagnostici in vitro o quelli che sono stati pubblicati in libri di testo autorevoli, testi o riviste sottoposti a revisione tra pari, o in standard o linee guida di consenso internazionali e nazionali, o in regolamenti nazionali o regionali.

NOTA. Fonti dei metodi

ISO identifica come fonti da cui prendere i metodi di esame sia istruzioni per l'uso di IVD, libri di testo autorevoli, testi o riviste sottoposti a revisione tra pari, o in standard o linee guida di consenso internazionali e nazionali, o in regolamenti nazionali o regionali.

Al di là dell'ampio ventaglio di possibilità descritto dalla norma, i laboratori corrono il rischio di confondere i metodi con i principi su cui i metodi stessi si fondano.

La precedente versione di ISO 15189 chiedeva di documentare "b) principio e metodo della procedura utilizzata per gli esami;" (punto 5.5.3). La nuova versione al punto 7.4.1.6 chiede di comunicare con i risultati degli esami "f) identificazione del metodo d'esame utilizzato, ... e del principio di misurazione;". Sembra quindi conservata la distinzione tra principio e metodo.

ISO 17025 chiede di validare i metodi e stimare l'incertezza di misura basandosi sulla comprensione dei principi teorici del metodo (punti 7.2.2.1 e 7.6.3).⁵¹

Ad esempio, il documento CLSI C50 (Spettrometria di massa nel laboratorio clinico) contiene una comprensione generale della spettrometria di massa e dei principi che ne determinano l'applicazione nel laboratorio clinico. Include linee guida, riferimenti e marcatori di garanzia della qualità che aiuteranno nell'implementazione e nel corretto funzionamento di un sistema di spettrometria di massa (MS) per le sue numerose applicazioni. Sono incluse informazioni sul mantenimento di prestazioni ottimali, sugli approcci per garantire una misurazione accurata e precisa della massa, sulla verifica dei metodi, sul controllo di qualità dei dosaggi all'interno e tra gli strumenti, sulla risoluzione dei problemi dello strumento, sulla preparazione dei campioni, sull'interpretazione dei risultati e sui limiti della tecnologia.⁵² CLSI C50 non contiene specifici metodi, quindi non può essere una fonte di metodo di esame, nonostante sia molto autorevole. Lo stesso accade con documenti di fonte legislativa, ad esempio la Delibera della Regione del Veneto n. 2053 del 2007 per la tubercolosi.⁵³

⁵¹ UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018. Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura

⁵² CLSI). Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory: General Principles and Guidance; Approved Guideline. CLSI document C50-A (ISBN 1-56238-648-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2007

⁵³ DELIBERAZIONE DELLA GIUNTA REGIONALE n. 2053 del 03 luglio 2007. Nuove Linee guida per il controllo della Tubercolosi nella Regione Veneto e costituzione Comitato Strategico per la lotta alla TBC. Bur n. 65 del 24 luglio 2007.
<https://bur.regione.veneto.it/BurVServices/pubblica/DettaglioDgr.aspx?id=198620>

Un aiuto importante alla definizione dei concetti viene da VIM3.⁵⁴ Principio di misura è il fenomeno a fondamento di una misurazione, che può essere di natura fisica, chimica o biologica (2.4). Ad esempio, l'assorbimento di energia applicato alla misurazione della concentrazione di quantità di sostanza. Metodo di misura invece è la descrizione generale dell'organizzazione logica delle operazioni messe in atto in una misurazione (2.5). Infine, procedura di misura, procedura operativa, procedura è la descrizione dettagliata di una misurazione eseguita in conformità a uno o più principi di misura e a un determinato metodo di misura, fondata su un modello di misura e comprendente tutti i calcoli necessari per ottenere un risultato di misura (2.6). VIM osserva che in Italia (non altrove) nel settore chimico si utilizza il termine «metodo» per designare una procedura di misura. Aggiunge anche che una procedura di misura è documentata con un dettaglio sufficiente a consentire all'operatore di eseguire la misurazione. Precisando che il modello di misura è la relazione matematica tra tutte le grandezze note per essere coinvolte in una misurazione (2.48).

Tutte le procedure e la documentazione di supporto, come istruzioni, standard, manuali e dati di riferimento relativi alle attività di laboratorio, devono essere aggiornate e prontamente disponibili per il personale (vedere 8.3). Il personale deve seguire le procedure stabilite e l'identità delle persone che svolgono attività significative nei processi di esame deve essere registrata, compresi gli operatori POCT. **Personale autorizzato deve valutare periodicamente i metodi di esame forniti dal laboratorio per garantire che siano clinicamente appropriati per le richieste ricevute.**

Validazione dei metodi di esame (punto 7.3.3)

Poiché nel percorso dell'esame di laboratorio, dalla progettazione, all'utilizzo, fino alla disattivazione, la validazione avviene prima della verifica, in questo documento il punto 7.3.3 viene trattato qui prima del punto 7.3.2.

ISO 15189 al punto 7.3.3 chiede di validare i metodi di esame progettati o sviluppati dal laboratorio, utilizzati al di fuori delle istruzioni per l'uso del produttore o dell'intervallo di misurazione originariamente convalidato, reagenti di terzi utilizzati su strumenti diversi da quelli previsti e per i quali non sono disponibili dati di convalida, metodi convalidati successivamente modificati.

La validazione deve essere ampia quanto necessario e confermare, mediante la fornitura di prove oggettive sotto forma di specifiche di prestazione, che i requisiti per l'uso previsto dell'esame sono stati soddisfatti. L'estensione della validazione di un metodo di esame deve essere sufficiente a garantire la validità dei risultati pertinenti al processo decisionale clinico.

NOTA. Caratteristiche prestazionali e validità fondazionale

La precedente versione di ISO 15189 elencava le caratteristiche prestazionali nel testo al punto dedicato alla validazione. La nuova versione invece riporta l'elenco nel glossario, alla voce 3.31 validazione. In particolare, nella Nota 3 alla voce si afferma che i requisiti specifici di un metodo d'esame possono includere: esattezza della misurazione, precisione della misurazione, compresa la ripetibilità della misurazione e precisione intermedia della misurazione, selettività, comprese le sostanze interferenti, limite di rilevazione e limite di quantificazione, intervallo di misurazione, rilevanza clinica, specificità diagnostica e sensibilità diagnostica. Qui usiamo il termine selettività,

⁵⁴ UNI CEI 70099:2008. Vocabolario Internazionale di Metrologia - Concetti fondamentali e generali e termini correlati (VIM)

segundo VIM. Tutte queste caratteristiche costituiscono la «validità fondazionale» in metrologia.⁵⁵

ISO 15189 chiede che personale con l'autorizzazione e le competenze appropriate deve esaminare i risultati della validazione e registrare se i risultati soddisfano i requisiti specificati. Quando si propongono modifiche a un metodo di esame validato, si deve esaminare l'impatto clinico e decidere se applicare il metodo modificato. Devono essere conservate le registrazioni su procedura di validazione utilizzata, requisiti specifici per l'uso previsto, la determinazione delle specifiche di prestazione del metodo, i risultati ottenuti, una dichiarazione sulla validità del metodo, che ne illustri l'idoneità all'uso previsto.

⁵⁵ Ferrero A, Scotti V. Metrologia forense. Un'introduzione ai principi della metrologia per magistrati, avvocati e periti forensi. Bologna: Libreria Esculapio; 2023

NOTA. Guide a verifica e validazione: il caso dell'amplificazione di acidi nucleici

ISO adotta per i suoi documenti un procedimento di approvazione e revisione abbastanza complesso per garantire l'affidabilità dei contenuti. Per questo, non sono molte le guide applicative pubblicate da ISO, per le quali i tempi di revisione potrebbero comprometterne la validità.

Una eccezione è la recente ISO 17822 per la qualità dei metodi basati sull'amplificazione degli acidi nucleici⁵⁶. Metodi la cui crescente diffusione rende il documento di grande interesse.

ISO 17822 descrive i requisiti particolari della pratica clinica di laboratorio per garantire la qualità della rilevazione, dell'identificazione e della quantificazione degli agenti patogeni microbici mediante prove di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT). È destinato ai laboratori che sviluppano e/o implementano e utilizzano o eseguono NAAT per scopi medici, di ricerca o sanitari. Non si applicherebbe allo sviluppo di dispositivi medici diagnostici in vitro (IVD) da parte dei produttori. Tuttavia, include la verifica e la convalida di tali dispositivi e/o dei processi corrispondenti quando vengono applicati e utilizzati dai laboratori. ISO 17822 nasce come 17822-2, ma successivamente ha sostituito ISO 17822-1 restando come norma unica con questo numero.

ISO 17822 si riferisce a diversi documenti CLSI, come EP23, MM03, MM06, QMS01, MM13, EP18, MM19, EP17, MM07, EP07. ISO 17822 prescrive l'uso di materiali di controllo e ne descrive diverse tipologie. Per le indicazioni generali rimanda allo standard ISO 20395. Possono essere controlli negativi (tampone, bianco, reazione senza enzima, materiale senza genoma specifico) oppure positivi (materiale biologico o soluzione di acido nucleico ben definita, matrice addizionata di sequenza nucleica specifica, sia qualitativa che quantitativa).⁵⁷

In questa sede interessano le parti di ISO 17822 dedicate a verifica o validazione dei metodi, descritti nel testo e nell'Allegato B. ISO 17822 individua due approcci: confronto di metodi e recupero di aggiunta al campione. Il confronto dei metodi è applicabile se il laboratorio ha già adottato un metodo validato o se ha accesso a un metodo validato in un altro laboratorio clinico. È preferibile che per il confronto del metodo vengano utilizzati campioni di pazienti locali. L'approccio con il recupero di aggiunta è utile in particolare la componente dell'esattezza dell'accuratezza.

Per gli studi di esattezza si devono distribuire le prove su un periodo di tempo che rifletta le prestazioni del test nelle condizioni tipiche del laboratorio. Per i metodi multicanale, è necessario utilizzare diversi studi comparativi. Il metodo di analisi dei dati appropriato per stabilire l'esattezza deve essere scelto per ogni singolo misurando e per l'intero dosaggio multicanale. Il numero appropriato di campioni dipende da fattori quali la complessità e la precisione, la prevalenza del bersaglio nella popolazione indicata, l'accuratezza stabilita del metodo di riferimento/di confronto, lo schema utilizzato per l'analisi statistica dei dati e il livello accettabile di confidenza statistica e i costi. ISO 17822 raccomanda di misurare non meno di 20 e in genere 40-50 o più campioni.

Nelle prestazioni è compreso l'intervallo di rilevazione per i risultati quantitativi. Gli elementi concettuali possono essere applicati ai metodi discreti che vengono riportati come qualitativi.

Ancora nelle prestazioni sono comprese le diverse misure di accuratezza diagnostica, la proprietà discriminativa dell'esame, altre sono utilizzate per valutare la sua capacità predittiva.

Per ISO 17822 gli studi per determinare la precisione devono essere eseguiti con campioni selezionati o preparati in una matrice il più possibile simile ai campioni clinici. I materiali di prova possono includere standard, materiali di controllo della qualità, campioni per VEQ o campioni di pazienti in quantità sufficiente per completare lo studio. Gli studi di precisione devono verificare la

ripetibilità, la precisione intermedia e la riproducibilità.

Per i metodi qualitativi, lo studio di precisione deve fornire una stima a concentrazioni prossime al limite di rilevazione ma lo studio deve comprendere campioni a livelli nell'intero intervallo dinamico del metodo: Uno con una concentrazione al limite di rilevazione, uno con una concentrazione del 20% superiore al limite di rilevazione e uno con una concentrazione del 20% inferiore al limite di rilevazione. I tre campioni potrebbero essere misurati in repliche fino a 40.

Per i metodi quantitativi, si deve includere nello studio di precisione almeno un campione di alto livello, un campione di basso livello e un campione il più vicino possibile al livello decisionale medico (di solito il limite di rilevamento). Se ci sono grandi differenze nelle stime di precisione ai tre livelli, può essere necessario aggiungere ulteriori concentrazioni per descrivere completamente le prestazioni di precisione.

L'imprecisione è spesso espressa come valore bersaglio più o meno due o tre ST o come valore target più o meno una percentuale (ad esempio, 10 %). In generale, la precisione intorno al valore medio non dovrebbe superare il 15% del CV, tranne che in corrispondenza del LLOQ, dove la precisione non dovrebbe superare il 20%. Per determinare le prestazioni accettabili della precisione, si raccomanda di costruire profili di precisione in cui ST o CV sono tracciati in funzione della concentrazione.

ISO 17822 chiede il limite di rilevazione (LOD) per i metodi quantitativi e qualitativi come la più bassa concentrazione di un misurando che può essere rilevata in modo coerente con una precisione accettabile. Chiede altresì studi di reattività crociata e di interferenza. Gli organismi cross-reattivi comprendono quelli che condividono l'omologia di sequenza con il bersaglio, quelli della flora normale che potrebbero essere presenti nel campione e organismi che causano stati patologici simili o infezioni clinicamente rilevanti. Servono anche studi di interferenza per l'effetto di sostanze aggiunte ai campioni contenenti l'acido nucleico di interesse. L'interferenza/reattività incrociata deve essere stabilita per ogni tipo di campione, con materiale interferente adatto alla matrice del campione.

Per determinare LOD in modo empirico sono proposte diluizioni seriali di campioni con una concentrazione nota della sostanza bersaglio, nell'intervallo del limite di rilevamento previsto. LOD deve essere determinato per ogni tipo di matrice di campione e per genotipo, se ragionevole. Per l'elaborazione dei dati, va utilizzata un'analisi probit per determinare empiricamente la più bassa concentrazione che può essere rilevata. L'analisi di regressione probit dà come risultato valori di unità di probabilità, che vengono convertiti in valori C95 (concentrazione rilevabile nel 95% dei campioni), indicando che il limite di rilevazione è un numero definito di copie/ml e che i campioni contenenti tale concentrazione verrebbero rilevati nel 95% dei campioni analizzati. Per i dosaggi multicanale, LOD deve essere determinato per ciascun misurando.

Infine, ISO 17822 definisce la caratteristica 3.43 robustezza, ovvero la capacità di un metodo di procedere in modo ottimale, nonostante lievi variazioni delle condizioni. Di solito si riferisce alla PCR (3.34) in cui l'amplificazione avviene nonostante lievi variazioni delle condizioni di reazione,

⁵⁶ 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

⁵⁷ 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

come la concentrazione di DNA (3.17).

NOTA. Guide generali a verifica e validazione dei metodi

CLSI mette a disposizione diversi documenti, per precisione ed esattezza, per il limite di rilevabilità (LOD), per una verifica rapida delle prestazioni come, ad esempio, prima dell'attivazione di una strumentazione di laboratorio.

EP15⁵⁸ contiene al Capitolo 2 lo studio di verifica della precisione, che prevede un periodo di familiarizzazione, descrive i limiti dello studio di verifica della precisione, il disegno della procedura sperimentale. Nel capitolo 3 si tratta la stima dello scarto sistematico attraverso la misura di materiali a concentrazione nota, con la selezione dei materiali di riferimento, l'individuazione dei valori bersaglio e la loro incertezza, dei valori medi e loro incertezza, l'intervallo di verifica, l'interpretazione e un esempio di lavoro. È completato dall'Appendice A con disegni sperimentali e valori mancanti per lo studio di verifica della precisione, dall'Appendice B con i calcoli di precisione e dall'Appendice C per i materiali a concentrazione nota.

Il campo di applicazione di EP15 è limitato alla verifica, mentre per validare le prestazioni della procedura di misurazione rispetto alle esigenze dell'utente esistono altri protocolli CLSI più rigorosi. Ad esempio, i documenti CLSI EP06, EP17, e EP28). CLSI EP05 e EP09 sono stati pensati per i produttori.

La verifica della precisione di EP15 è un piccolo esperimento che prevede misurazioni ripetute di due o più campioni nell'arco di (almeno) cinque giorni. Serve per valutare la coerenza delle prestazioni di imprecisione del metodo rispetto alle indicazioni prestabilite. Può essere anche utilizzata per la valutazione della precisione come azione correttiva dopo un fallimento di VEQ, durante gli studi di ottimizzazione del metodo o come parte delle attività di risoluzione dei problemi dello strumento. Lo studio prevede almeno due campioni con diverse concentrazioni. Lo schema di base 5 × 5 - cinque giorni, una prova al giorno, cinque repliche per prova - dovrebbe produrre un totale di 25 risultati per campione. Per migliorare le stime, l'esperimento potrebbe essere esteso, preferibilmente in altri giorni, per uno o più campioni. Ad esempio, si potrebbero usare solo quattro repliche per ciascun campione in ognuno dei sette giorni.

EP15 si occupa dei valori "isolati" statistici (outliers). EP15 raccomanda una versione del test di Grubbs. Dove un risultato si qualifica come isolato statistico se, e solo se, si trova a più di G ST dalla media del campione, dove: media e ST si basano su tutti gli N risultati del campione, compreso il sospetto isolato. Il fattore G di Grubbs (che dipende da N) si ricava dalla tabella 3 di EP15.

L'analisi della varianza a una entrata (ANOVA) è la base per il calcolo delle stime di ripetibilità e di imprecisione intra-laboratorio. Il risultato di una procedura di ANOVA a una entrata è una tabella. Lo scopo di ANOVA è quello di suddividere la variabilità totale in frazioni interne al gruppo e fra gruppi. Nel contesto di questa linea guida, il fattore di raggruppamento è la serie o seduta.

Dopo lo studio di verifica della precisione, si deve verificare la coerenza di ciascuna di queste stime con le dichiarazioni del fabbricante. Se l'imprecisione non supera la dichiarazione corrispondente

⁵⁸ CLSI EP15. User Verification of Precision and Estimation of Bias, 3rd Edition, September 11, 2014. This reaffirmed document has been reviewed and confirmed as suitable to remain published without revision to content, as of September 2019.

del fabbricante, soddisfa il criterio di coerenza. Se invece l'imprecisione supera la dichiarazione del produttore, l'utente deve attuare e confrontare la stima con il corrispondente limite superiore di verifica (UVL). Per il calcolo degli UVL EP15 descrive un approccio di tipo tabellare in tre fasi. Prima di determinano i gradi di libertà, df. Quindi dalla Tabella 7. 3, si calcola UVL dal fattore UVL F e dalla dichiarazione del produttore. Utilizzando i gradi di libertà, df, si determina il fattore UVL F dalla tabella 7 in base al numero totale di campioni utilizzati nell'intero studio. Infine, si calcola UVL come fattore UVL F moltiplicato per la relativa dichiarazione.

Lo scarto sistematico viene valutato con materiali a concentrazione nota, come materiali da VEQ e/o altri standard di riferimento, e confrontando i risultati della procedura di misurazione in esame con i valori bersaglio. EP15 descrive un processo che prevede misurazioni ripetute di materiali ("materiali di riferimento") con concentrazioni note per verificare che lo scarto sistematico di un metodo sia entro i limiti consentiti a una o più concentrazioni clinicamente rilevanti. Questo tipo di esperimento per "dimostrare l'esattezza" è chiamato anche studio di "recupero" o "stima dello scarto". Per lo studio è necessario ricavare due statistiche dai dati: media complessiva dell'esperimento (ad esempio, misurazioni "5 × 5"), e il suo errore standard. Il primo passo è calcolare la differenza tra media e valore bersaglio. Il successivo consiste nel calcolare l'errore standard di questa differenza. Il calcolo finale consiste nel definire un intervallo di verifica (VI) che abbia una probabilità del 95% di contenere la differenza vera. Questo calcolo si ottiene moltiplicando l'errore standard per un "fattore di copertura", k. Il moltiplicatore, k, può essere 2 o 3 per avere probabilità del 95% e del 99%, rispettivamente. Lo scarto calcolato viene quindi confrontato con l'intervallo di verifica. EP15 descrive i calcoli necessari e include tabelle che semplificano i calcoli per esperimenti composti da cinque a sette sedute, con cinque repliche per serie. La sezione 3.6 tratta l'interpretazione dei risultati e la sezione 3.7 presenta diversi esempi pratici.

Il disegno sperimentale è lo stesso di quello descritto per la verifica delle indicazioni di precisione. Il disegno sperimentale "5 × 5" descritto per lo studio di verifica della precisione nel Capitolo 2 è ugualmente raccomandato per elaborare i materiali di riferimento con la procedura in questione come base per stimare i suoi bias rispetto ai TV dei materiali di riferimento. Questo processo comporta il dosaggio di ciascuno dei materiali di riferimento per cinque o più giorni (non necessariamente consecutivi), con un'analisi al giorno e cinque repliche per ogni analisi, per un totale di 25 risultati per campione, supponendo che non vi siano valori mancanti e che non vi siano risultati trattati come anomalie statistiche. Se l'intervallo di verifica include la media osservata, lo scarto non è statisticamente significativo (non è dimostrato che sia diverso da zero). Se l'incertezza combinata estesa supera lo scarto consentito specificato, l'esperimento non dispone di dati sufficienti. Sono necessarie altre prove.

Per EP15 l'intervallo di verifica deriva dall'errore standard combinato e dai gradi di libertà, se necessario calcolati secondo l'approssimazione di Satterthwaite. Il risultato è ottenuto da una tabella scelta in base al numero delle serie. Il calcolo si avvale poi del quantile t di Student per una probabilità di 0,975 (che corrisponde a un livello di confidenza del 95%).

In attesa della revisione di EP15, prevista a partire dal 2024, dopo tre correzioni al testo originario, CLSI ha pubblicato due guide applicative. EP15IG1⁵⁹ si occupa della verifica di precisione. Il protocollo descritto è esattamente quello di EP15, rappresentato anche graficamente, ma i calcoli

⁵⁹ CLSI EP15IG1. User Verification of Precision Implementation Guide, 1st Edition, August 26, 2021

sono facilitati dalla disponibilità di un foglio di calcolo scaricabile. EP15IG2⁶⁰ d'altra parte di occupa della verifica dello scarto sistematico (esattezza). Anche in questo caso il protocollo è quello di EP15 e i calcoli si avvalgono del foglio elettronico scaricabile.

CLSI affianca ai documenti base sulla valutazione dei metodi una guida per una sorta di verifica rapida delle caratteristiche prestazionali, da usare nei laboratori in specifiche situazioni. Tipicamente, prima di utilizzare un nuovo metodo o un nuovo strumento, per prendere una decisione preliminare sulla sua accettabilità, che non sia né una caratterizzazione rigorosa delle prestazioni né una valutazione dei molti fattori che possono influenzare i risultati. Serve un controllo rapido per escludere problemi importanti e un punto di partenza per accumulare dati ed esperienze. Si vuole aiutare a individuare i problemi che richiederebbero una correzione immediata, un rinvio al produttore o un'indagine più approfondita prima di mettere in servizio un nuovo dispositivo. Le guide disponibili sono EP10A3AMD⁶¹, in revisione nel 2024, e la guida applicativa EP10IG⁶². EP10A3AMD è stato già sottoposto al cosiddetto "Processo di revisione limitata" per alcune modifiche, tra cui riedizione e condensazione delle sezioni per migliorare la leggibilità, aggiunta di informazioni sul modello delle fasi di vita dell'esame (CLSI EP19 {9001}) e su quali fasi l'EP10 può essere applicabile, ulteriori indicazioni nel Capitolo 2 sui materiali e sulle procedure/ materiali di riferimento, chiarimento della clausola 7.2 sull'ispezione visiva per i valori anomali, riferimento ai documenti CLSI correlati per le indicazioni sulla validazione o la verifica delle caratteristiche di prestazione, aggiornamento delle figure. EP10 contiene la guida per grafica e ispezione dei dati iniziali, grafico delle differenze, ispezione visiva per valori anomali, ispezione visiva per la linearità, analisi dei dati per l'imprecisione, valutazione preliminare dello scarto sistematico, analisi completa dei dati, utilizzo di EP10 da parte dei produttori, come eseguire la regressione multipla.

EP10 prevede tre miscele stabili che coprano l'intervallo di misurazione dichiarato o l'intervallo rilevante dal punto di vista medico. Tali materiali possono essere ottenuti commercialmente (ad esempio, materiali di controllo o verifica di linearità) o possono essere realizzati da campioni di pazienti. La concentrazione del livello medio deve essere esattamente a metà strada tra le concentrazioni di livello alto e basso. La matrice deve essere commutabile con i requisiti del metodo.

L'esperimento consiste in una serie di misure eseguite in diversi giorni. Il primo campione viene utilizzato per avvinare il sistema. La seguente sequenza specifica deve essere misurata senza modifiche, interruzioni o campioni intermedi: Medio, Alto, Basso, Medio, Medio, Basso, Basso, Alto, Alto, Medio.

Molti strumenti moderni sono ad accesso casuale, ovvero la modalità sequenziale potrebbe non essere eseguita, ciò che invalida le ipotesi utilizzate nella regressione multipla e può dare risultati non validi. È necessario eventualmente configurare o programmare lo strumento per elaborare i campioni nell'ordine rigoroso descritto. Per una valutazione approfondita del trascinamento dei

⁶⁰ CLSI EP15IG2. User Verification of Bias (Trueness) Implementation Guide, 1st Edition, August 26, 2021

⁶¹ CLSI EP10A3AMD. Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Measurement Procedures, 3rd Edition, May 14, 2014.

⁶² CLSI EP10IG. Preliminary Evaluation of Quantitative Medical Laboratory Measurement Procedures Implementation Guide, 1st Edition, April 6, 2022.

reagenti e dei campioni abbiamo i documenti CLSI EP47 e EP48.

Per i laboratori medici, deve essere eseguita almeno una prova al giorno per almeno cinque giorni. Il numero di giorni e di prove può essere ampliato a piacere (ad esempio, i produttori di sviluppatori possono scegliere di includere più prove).

I dati di questo esperimento possono essere analizzati in vari modi. Tuttavia, i dati devono prima essere graficati per valutare visivamente la dispersione delle osservazioni e per visualizzare i risultati contemporaneamente a tutti e tre i livelli. Dal grafico è possibile valutare visivamente la precisione, l'esattezza e la non linearità. L'esame accurato del grafico dei dati per individuare gli anomali (cioè singoli punti che si distaccano dal gruppo principale di punti a livello di concentrazione) richiede un giudizio individuale. Il trattamento degli isolati è particolarmente critico in un esperimento così piccolo, perché un punto staccato può influenzare notevolmente l'analisi dei dati. Occorre fare ogni sforzo per determinarne la causa, e se viene osservato in più di un'esecuzione, si agisce per risolvere il problema, oppure includere il punto di dati apparentemente incriminato nell'analisi successiva, oppure terminare questa indagine preliminare e iniziare una valutazione più approfondita delle fonti di errore.

Il grafico delle differenze deve essere esaminato per eventuali indicazioni di non linearità. Se i dati non appaiono lineari, si valuta se il coefficiente dell'analisi di regressione lineare multipla è significativo su più di una corsa o nell'analisi riassuntiva di tutte le corse e quindi includere una valutazione completa della linearità, come del CLSI EP06.

La guida applicativa EP10IG⁶³ rimanda per elaborare i dati al foglio elettronico EP10-Ed3-WB. 6. Il foglio di lavoro grafica automaticamente i risultati. Si controlla che i grafici non presentino scarto sistematico che, in linea retta, diventa minore o maggiore con l'aumentare della concentrazione, indicando uno scarto proporzionale, oppure scarto per il campione a media concentrazione, indicando una relazione non lineare, come pure una variazione consistente in un campione dal giorno 1 al giorno 5, ovvero instabilità giornaliera del sistema. Infine, una variazione consistente in un campione tra le tre repliche, indicando un possibile trascinamento.

CLSI EP10 presuppone la disponibilità del sistema di misurazione, prima di iniziare la messa in opera. Difficile da collocare nei processi di acquisto delle amministrazioni più articolate. È stata proposta l'eventualità di eseguire le prove della procedura EP10 presso una sede opportuna, come un altro laboratorio o addirittura lo stesso fabbricante o distributore.

NOTA. Guide per la capacità di rilevazione (LoB, LoD, LoQ)

CLSI EP17⁶⁴ si occupa della capacità di rilevamento per le procedure di misurazione. Pubblicata nel 2012 è stata corretta nel giugno 2020. La revisione era attesa nel 2022, ma è stata anticipata da una linea guida, il documento EP17IG⁶⁵.

EP17 fornisce le linee guida per la valutazione e la verifica delle dichiarazioni di capacità di

⁶³ CLSI EP10IG. Preliminary Evaluation of Quantitative Medical Laboratory Measurement Procedures Implementation Guide, 1st Edition, April 6, 2022.

⁶⁴ CLSI EP17. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures, 2nd Edition, June 18, 2012. This edition of the document was corrected in June 2020.

⁶⁵ CLSI EP17IG. Evaluation of Detection Capability Implementation Guide, 1st Edition, August 26, 2021

rilevamento (cioè, limite del bianco [LoB], limite di rilevamento [LoD] e limite di quantificazione [LoQ]). È adatta sia ai prodotti commerciali che ai metodi sviluppati in laboratorio. Il limite di rilevazione (LoD) è stabilito sulla base della probabilità. Nelle misurazioni molecolare quantitativa e qualitativa, la più bassa concentrazione che può essere rilevata tipicamente in più del 95% dei campioni. Il limite di quantificazione (LoQ) è invece la quantità minima che può essere determinata quantitativamente con un'accuratezza dichiarata. Il limite del bianco (LoB) è il risultato più alto che è possibile osservare con una probabilità dichiarata per un campione privo del misurando.

EP17 puntualizza che LoB e LoD sono affrontati in modo diverso per i esami molto sensibili come le procedure di misurazione molecolare (ad esempio, gli esami sugli acidi nucleici). Qui LoB è impostato su zero e i campioni negativi non vengono utilizzati nel calcolo del LoB. LoD invece è il livello al quale una determinata percentuale (di solito il 95%) di risultati fornisce un risultato positivo, in genere sulla base di un'analisi dei dati di regressione probit (cioè, tasso di successo rispetto al valore medio dei replicati) (come descritto nel documento CLSI MM03).

EP17 descrive diversi approcci per la maggior parte dei casi, inclusi approcci non parametrici, parametrici, probit e profili di precisione per LoB e LoD. Le stime della capacità di rilevamento sono importanti per i metodi qualitativi in cui esiste un segnale strumentale continuo (ad esempio densità ottica), ma i risultati sono riportati come "positivi" o "negativi" (o equivalenti).

L'uso di un controllo di basso livello può rivelare un aumento della LoD di un metodo qualitativo, ad esempio a causa di cambiamenti nei reagenti, aumentando i risultati falsi negativi. I limiti di soglia per i metodi qualitativi si basano tipicamente sulla rilevabilità della presenza del misurando (ad esempio, acidi nucleici), o sulla posizione relativa rispetto a una soglia clinica. Il primo caso è di fatto LoB.

EP17 descrive tre protocolli: classico, profilo di precisione e probit. L'approccio classico utilizza misure effettuate su una serie di campioni bianchi e su una serie di campioni di basso livello intorno al LoD presunto. A seconda delle distribuzioni dei risultati viene selezionata un'opzione di analisi dei dati non parametrica o, più raramente, parametrica per calcolare le stime di LoB e LoD.

L'approccio del profilo di precisione è utile quando la variabilità dei risultati cambia significativamente nella regione del LoD presunto. L'approccio Probit serve per i metodi molecolari (ad esempio, per le malattie infettive, o per gli acidi nucleici), dove tutti i risultati dei campioni bianchi o negativi vengono normalmente riportati come negativi. Il tasso di falsi positivi è molto inferiore al 5% (in genere inferiore allo 0,5%) e il LoB, in genere, è considerato pari a zero. Il LoD è calcolato da un modello di regressione probit come la concentrazione alla quale, con una probabilità di solito 95%, i risultati danno una classificazione positiva.

Il protocollo minimo secondo EP17 è un sistema strumentale, tre giorni, quattro campioni, due repliche. Va raggiunto un numero minimo di 60 repliche per i campioni bianchi e di basso livello. Per il calcolo del limite del bianco l'opzione non parametrica non prevede ipotesi distributive e può essere utilizzata per qualsiasi serie di dati. È particolarmente appropriata se i risultati della misurazione del campione in bianco mostrano segni di taglio o una distribuzione non normale.

Invece il calcolo di LoD segue un'analisi parametrica, dal LoB. Può essere utilizzato un metodo statistico come il test di Cochran per confermarne l'applicabilità.

L'approccio del profilo di precisione si presta anche all'integrazione di uno studio LoD all'interno di studi di valutazione della precisione, come nel documento CLSI EP05.

L'approccio probit è utile per valutare il LoD nei metodi le cui capacità di rilevamento sono in

termini di numero di risultati positivi rispetto al numero totale di esami replicati e può essere utilizzato anche quando il LoB è utilizzato per definire i risultati "positivi". Inizialmente applicata all'efficacia dei pesticidi, l'uso dell'analisi probit si è poi esteso a diverse discipline, come la tossicologia, la microbiologia, la farmacologia e la virologia, in particolare con l'avvento delle tecniche di PCR. Un approccio correlato basato sulla funzione logit è molto simile, ma differisce in termini di funzione di probabilità sottostante (il logit ha code leggermente più piatte rispetto alla funzione probit).

Per LOD di misurandi con genotipi multipli vanno esaminati tutti i genotipi.

LoQ rappresenta la più bassa concentrazione che può essere misurata rispetto a obiettivi di accuratezza predefiniti. Quanto più severi sono i requisiti di accettazione, tanto più grande è il LoQ. LoQ, per definizione, è un attributo di prestazione applicabile solo alle procedure di misura quantitative.

Per ogni dichiarazione del fabbricante viene utilizzato un approccio di verifica comune. Un piccolo numero di campioni viene analizzato in replica nell'arco di più giorni, utilizzando un singolo lotto di reagenti e un singolo sistema strumentale. La percentuale di risultati di misurazione coerenti con la rispettiva indicazione viene calcolata e confrontata con il valore limite appropriato, indicato nella Tabella 1 di EP17. Se la proporzione osservata è inferiore al valore indicato nella Tabella 1, si può concludere che i risultati osservati non sono coerenti con l'indicazione. Per la verifica di una dichiarazione di LoB l'esperimento minimo è un lotto di reagenti, un sistema strumentale, tre giorni, due campioni di bianco, due repliche per campione al giorno, 20 repliche totali. È necessario aumentare uno o più fattori di progettazione per fornire un numero sufficiente di risultati di misura. Si calcola la percentuale di tutti i risultati delle misurazioni in bianco che sono inferiori o uguali alla dichiarazione LoB, per confrontare con il valore limite inferiore della Tabella 1.

Per la verifica di una dichiarazione del LoD il disegno sperimentale minimo è un lotto di reagenti, un sistema strumentale, tre giorni, due campioni alla concentrazione al limite di rilevabilità, due repliche per campione al giorno, 20 repliche totali. È necessario anche in questo caso aumentare uno o più fattori di progettazione per fornire un numero sufficiente di risultati. Si calcola la percentuale di tutti i risultati delle misurazioni a basso livello che sono uguali o superiori alla dichiarazione LoD, per confrontare con la tabella 1 di EP17.

Per la verifica di un LoQ dichiarato dal fabbricante, EP17 presenta un protocollo riferito a un obiettivo di precisione basato su scarto totale, ovvero con l'esperimento di precisione descritto nel documento EP15 del CLSI. Il disegno sperimentale minimo è un lotto di reagenti, un sistema strumentale, tre giorni, due campioni alla concentrazione oggetto della richiesta di LoQ, due repliche per campione al giorno, 20 repliche totali. È necessario aumentare uno o più fattori di progettazione per fornire un numero sufficiente di risultati.

Per ogni campione, EP17 calcola la finestra consentita intorno al valore bersaglio, conta il numero di risultati per ciascun campione che rientrano nella rispettiva finestra, quindi la percentuale di tutti i risultati che soddisfano i criteri di accettazione per la dichiarazione LoQ, confrontare la percentuale ottenuta con il valore limite inferiore della Tabella 1 di EP17. Se la percentuale osservata è maggiore o uguale al valore della Tabella 1, la verifica si considera riuscita.

Probit (unità di probabilità) è una funzione di trasformazione matematica per valori di rapporti o percentuali in unità di probabilità della distribuzione normale cumulativa. La regressione probit è l'analisi di regressione in cui la funzione di risposta Y può avere solo due risposte (cioè, rilevata o

non rilevata) e la variabile predittiva X è il valore medio delle misurazioni replicate, tipicamente utilizzata per le procedure di misurazione molecolare. EP17 nella Appendice C fornisce un esempio di LoD con l'approccio probit, per un esame di diagnostica molecolare per il quale il limite del bianco (LoB) è uguale a zero. Nell'esempio sono stati utilizzati tre lotti di reagenti per un esame microbiologico sul DNA batterico. Il protocollo richiede un minimo di tre campioni. È preparata una serie di diluizioni di cinque concentrazioni e per ogni diluizione è stata eseguita una serie di repliche utilizzando tre lotti di reagenti. Inoltre, è stata preparata una miscela negativa per dimostrare che $LoB = 0$.

L'uso tipico dell'approccio probit segue un protocollo dose-risposta a diluizione limitata. Una serie di diluizioni seriali viene effettuata a partire da un campione iniziale di contenuto noto. Le misure replicate danno uno dei due esiti: rilevato o non rilevato. Per ogni diluizione, viene calcolato un rapporto come il numero di esiti "rilevato" rispetto al numero totale di repliche. Questi tassi sono convertiti in unità di probabilità normale cumulativa (probit) e rispetto alle concentrazioni di misurando. Infine, con la regressione si calcola la concentrazione corrispondente a un tasso di risposta positiva predefinito (ad esempio, 0,95), che viene quindi assunto come LoD. Il disegno sperimentale minimo prevede due lotti di reagenti, un sistema strumentale, tre giorni, tre campioni di contenuto noto (campioni positivi), 30 campioni individuali negativi di pazienti, cinque diluizioni per campione positivo, 20 repliche per diluizione (in tutti i giorni di test) per campione positivo per lotto di reagenti, due repliche (in tutti i giorni di test) per campione negativo per lotto di reagenti.

Il documento EP17IG⁶⁶ ripete in sintesi i protocolli descritti da EP17, ma non considera l'approccio proibito.

NOTA. Metriche di qualità per NGS

La revisione di ISO 15189 è stata elaborata dal WG1 di ISO/TC 21210 seguendo le indicazioni di ISO's Committee on Conformity Assessment (CASCO).⁶⁷ CASCO è il comitato ISO che lavora su questioni relative alla valutazione della conformità. Le raccomandazioni espresse da CASCO a ISO/TC 212 erano di usare ISO/IEC 17025:2017 come modello, incorporare ISO 22870 (la norma per i Point-of-care) e stabilire collegamenti con ISO 15190 (salute e sicurezza), ISO 22367 (gestione dei rischi, anche questa in revisione) e ISO/TS 20658 (fase preesame). Inoltre, ISO chiedeva ai redattori di evitare requisiti troppo prescrittivi ed eventuali ridondanze con altri documenti ISO.⁶⁸

Il risultato della revisione ha rispettato solo parzialmente le direttive ISO.⁶⁹ A parte le differenze con ISO 17025, un esempio è costituito dal tema delle procedure di esame basate sulla tecnologia recente sequenziamento massivo parallelo (MPS) o Next Generation Sequencing (NGS).⁷⁰ Un altro dal tema dell'incertezza di misura dei risultati qualitativi.⁷¹

Gli esami basati sul sequenziamento si sono evoluti da ricerca di singoli geni a misure sull'intero genoma. Le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS) hanno in gran parte sostituito il sequenziamento Sanger e si sono affermate nella gestione medica dei disturbi ereditari e dei tumori. Le applicazioni cliniche NGS più recenti includono la tipizzazione dell'antigene leucocitario umano, i test prenatali non invasivi, il sequenziamento del DNA tumorale circolante nel sangue periferico e il sequenziamento dell'RNA. Sebbene le applicazioni NGS abbiano subito importanti semplificazioni tecniche, l'attuazione continua a essere complessa.

ISO ha prodotto per NGS/MPS un pacchetto composto da diversi documenti.

ISO/FDIS 20397-1:2021 è sulla valutazione della qualità dei campioni di acido nucleico. Contiene le linee guida generali per la preparazione delle librerie e la valutazione della qualità delle librerie prima del sequenziamento e della generazione dei dati. ISO/FDIS 20397-2:2020 è per la valutazione, la validazione e il controllo della qualità dei dati di MPS. ISO/NP 20397-3:2022 è per la preparazione dei campioni dedicati alla metagenomica, la generazione e l'analisi dei dati di

⁶⁶ CLSI EP17IG. Evaluation of Detection Capability Implementation Guide, 1st Edition, August 26, 2021

⁶⁷ 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

⁶⁸ NATA Team. ISO 15189 Revision Update. Media Releases. June 29, 2020. Available from <https://nata.com.au/news/iso-15189-revision-update/>

⁶⁹ Pradella M. New ISO standards for medical biology laboratories, prescriptions and deviations. Annales de Biologie Clinique. 2022;80(5):451-453. doi:10.1684/abc.2022.1755

⁷⁰ Pradella M. Qualità dei metodi di sequenziamento massivo parallelo/sequenziamento di nuova generazione (MPS/NGS). La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio 2023 May 31. DOI: 10.23736/S1825-859X.23.00190-1 (con materiale supplementare).

⁷¹ Pradella M. New Guides for Uncertainty of Qualitative Results. J Appl Lab Med 2023; 8:217–218. DOI: 10.1093/jalm/jfac087.

sequenza metagenomica ottenuti da piattaforme di MPS Il processo di metagenomica specificato comprende le seguenti fasi: a) Strategia e processo di campionamento, inclusi tipo, conservazione, trasporto, estrazione, qualità; b) Preparazione della libreria di acidi nucleici; c) Strategia e valutazione del sequenziamento; d) Costruzione del database; e) Analisi bioinformatica e rapporto; f) Convalida e valutazione del flusso (pipeline) bioinformatico e della base di dati. ISO DTS 24420:2021 (alla fine del percorso di votazione nel febbraio 2023) illustra il flusso di lavoro per l'elaborazione dei dati di sequenze metagenomiche "a sparafucile" (shotgun) (Lista glossario supplementare) di microbiomi e metagenomi ambientali derivati dall'ospite. Contiene i requisiti per il controllo di qualità dell'elaborazione dei dati di sequenze metagenomiche del tipo "sparafucile" per il sequenziamento massivo parallelo del DNA. ISO 24420:2021 si applica all'archiviazione, alla condivisione e all'interoperabilità dei dati di sequenze metagenomiche tipo "sparafucile".

ISO 20395:2019 fornisce i requisiti generici per valutare le prestazioni e garantire la qualità dei metodi utilizzati per la quantificazione di specifiche sequenze di acido nucleico (target). Riguarda la quantificazione di sequenze di DNA (acido desossiribonucleico) e RNA (acido ribonucleico) utilizzando tecnologie di amplificazione digitale (dPCR) o PCR quantitativa in tempo reale (qPCR). Si applica alle sequenze presenti in molecole di acido nucleico, tra cui DNA a doppio filamento (dsDNA) come il DNA genomico (gDNA) e il DNA plasmidico, DNA a singolo filamento (ssDNA), DNA complementare (cDNA), e RNA a singolo filamento (ssRNA), compresi l'RNA ribosomiale (rRNA), l'RNA messaggero (mRNA) e gli RNA non codificanti lunghi e corti (microRNA, miRNA) e RNA interferenti corti, siRNA), nonché l'RNA a doppio filamento (dsRNA).

ISO 20395:2019 si applica agli acidi nucleici derivati da fonti biologiche quali virus, cellule procariotiche ed eucariotiche, fluidi biologici privi di cellule (ad esempio plasma o terreni cellulari) o fonti in vitro (ad esempio oligonucleotidi, costrutti genici sintetici e RNA trascritto in vitro, IVT). Non è applicabile alla quantificazione di oligonucleotidi di DNA molto corti (<50 basi).

ISO 20395:2019 copre progettazione dei metodi di quantificazione (numero di copie di acido nucleico con curva di calibrazione come nella qPCR o attraverso il conteggio molecolare come nella dPCR); quantificazione e controllo di qualità della massa di acido nucleico totale; progettazione del metodo PCR, ottimizzazione, prove di specificità in silico (simulazione informatica) e in vitro; convalida del metodo (precisione, linearità, limite di quantificazione, limite di rilevamento, veridicità e robustezza) con requisiti specifici per qPCR e dPCR; approcci per stabilire la tracciabilità metrologica e stimare l'incertezza di misura.

La qualità o "validità fondazionale" della determinazione della sequenza mediante MPS dipende da molti fattori, tra cui, ma non solo, la qualità del campione, la preparazione della libreria, la selezione della piattaforma e la qualità dei dati di sequenziamento. ISO segnala come venga sovente facilmente trascurata la qualità nelle fasi del processo, oggetto delle cosiddette "metriche di controllo", la cui conoscenza è essenziale per l'analisi a valle delle sequenze. Il documento ISO 20397-2 fornisce un elenco di metriche per la valutazione della qualità dei dati di sequenziamento MPS/NGS e persino le raccomandazioni specifiche per diverse piattaforme MPS/NGS realmente commercializzate per i laboratori.

I laboratori medici devono comprendere appieno la chimica alla base della generazione di sequenze per ciascuna piattaforma NGS utilizzata e la validazione deve includere la valutazione dei problemi noti specifici della piattaforma. Vanno definiti indicatori appropriati e soglie accettabili di qualità dei dati durante la generazione di sequenze NGS, ad esempio profondità di lettura media e minima, percentuale di basi al di sopra di un determinato punteggio di qualità, percentuale di letture con

qualità di mappatura adeguata e altri parametri e soglie che definiscono una corsa accettabile per ciascun esame specifico.

La qualità di NGS/MPS si costruisce come una piramide, dal basso verso l'alto, in 5 piani. Parte dai dati grezzi, sviluppa le metriche di qualità, le statistiche di mappatura, gli indicatori di qualità, infine con gli indicatori di qualità delle chiamate di varianti.

Dati grezzi (capitolo 4): a ciascun nucleotide di una sequenza deve essere assegnato un valore numerico (punteggio base di qualità) correlato all'accuratezza desunta del processo di chiamata della base. Devono poi essere registrate le statistiche di base (punto 4.3.2), tra cui, a titolo esemplificativo e non esaustivo, le seguenti: a) tipo di piattaforma, b) tipo di lettura, c) kit di preparazione della libreria, d) lunghezza della lettura, e) numero di letture; f) contenuto complessivo di guanina e citosina (GC), g) lunghezza totale della sequenza.

Inoltre, le metriche di controllo della qualità per la valutazione dei dati grezzi (punto 4.3.3) sono rappresentate da numerosi parametri numerici quantitativi, come ad esempio distribuzione della lunghezza della sequenza, contenuto di GC per sequenza, punteggio di qualità, livelli di duplicazione delle sequenze, tasso di errore, analisi k-meri, frammento N, distribuzione dei nucleotidi tra i cicli.

Le statistiche di mappatura sono distinte per le letture singola estremità (punto 5.3.1.2) e per letture di estremità accoppiata (punto 5.3.1.3).

Diversi parametri di controllo della qualità (punto 5.3.2 Indicatori di qualità) possono essere applicati a seconda delle applicazioni. Sono tutti valori di tipo numerico.

ISO 20397-2 descrive metriche di qualità anche per la "chiamata della variante" (capitolo 6). In queste metriche vediamo molti esempi quantitativi numerici, come punteggio di qualità delle varianti, percentuali di letture alleliche, numero totale di varianti, numero di falsi positivi, numero di falsi negativi, numero di disallineamenti allelici e genotipici, rapporto transizione/trasversione, rapporto varianti singole nucleotidiche eterozigote/omozigote.

L'appendice A di ISO 20397-2 riporta vari esempi reali di metriche di qualità per piattaforme MPS specifiche. Si tratta di Illumina HiSeq 4000, Thermo Fisher Proton, BGIC /MGI MGISEQ-2000, Oxford Nanopore PromethION, PacBio Sequel II Per ciascuna piattaforma sono forniti dati come il formato dei dati grezzi, la lunghezza della lettura, il punteggio di qualità, il contenuto GC, il tasso di duplicazione, la densità dei gruppi (cluster), il tasso di adattatori.

La recente linea guida CLSI MM09⁷² fornisce raccomandazioni per la progettazione, lo sviluppo, la validazione, la comunicazione dei risultati e la gestione continua della qualità dei metodi basati su NGS e su sequenziamento Sanger. Insieme a fogli di lavoro ed esempi didattici, MM09 fornisce una guida passo-passo per aiutare i laboratori medici a tradurre i requisiti normativi in pratica clinica.

MM09 fornisce una guida passo passo alla pianificazione e all'esecuzione degli studi di validazione in un apposito foglio di lavoro, dove la scheda A definisce le metriche delle prestazioni di misura e fornisce esempi di approcci per stabilirle, le schede B e C forniscono approcci per la mappatura dei campioni di validazione alle corse di sequenziamento, le schede D ed E forniscono esempi di sintesi dei risultati della validazione, la scheda F fornisce un esempio di rapporto riassuntivo completo dei

⁷² CLSI. Human Genetic and Genomic Testing Using Traditional and High-Throughput Nucleic Acid Sequencing Methods. 3rd ed. CLSI guideline MM09. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023.

risultati della validazione, utile per le ispezioni normative, la scheda G fornisce un esempio di riepilogo delle prestazioni di un metodo, comprese le limitazioni che dovrebbero essere indicate nei rapporti dei risultati clinici.

MM09 contiene capitoli tradizionali, basati sul testo, che delineano il processo di sviluppo dei metodi e forniscono un'introduzione di alto livello, le informazioni di base e il contesto necessario per lo sviluppatore, accanto a un collegamento a fogli di lavoro didattici (risorse condivise con il College of American Pathologists) che forniscono ulteriori informazioni e indicazioni concrete, compresi moduli adattabili dall'utente ed esempi didattici. Infine, appendici con risorse aggiuntive e informazioni dettagliate, comprese le descrizioni delle piattaforme tecnologiche.

La guida CLSI si articola nel capitolo 2 con il ciclo di vita dello sviluppo dei metodi di sequenziamento di nuova generazione, il capitolo 3 (Familiarizzazione, Progettazione, sviluppo e ottimizzazione, Paradigmi generali per la validazione, la rivalidazione e la verifica, conferma dei risultati, sistema di gestione della qualità, infrastruttura bioinformatica), il capitolo 4 (Applicazioni cliniche, sequenziamento Sanger, sequenziamento di nuova generazione per disturbi ereditari e tumori, sequenziamento dell'antigene leucocitario umano, esami prenatali non invasivi e biopsia liquida, sequenziamento dell'RNA). Si aggiungono le appendici A (Raccomandazioni e linee guida generali sul sequenziamento di nuova generazione), Appendice B (Dettagli aggiuntivi sulla progettazione e l'ottimizzazione), Appendice C (Esempi di applicazioni somatiche), Appendice D (Interpretazione e reportistica).

MM09 propone che per la validazione delle applicazioni somatiche, lo sviluppatore dell'esame deve considerare accuratezza, precisione, accordo percentuale dei positivi (PPA), selettività, limite del bianco (LoB) e limite di rilevamento (LoD), sostanze influenti interferenti. L'accuratezza si riferisce al grado in cui un esame rileva correttamente le varianti note e chiama correttamente i risultati di tipo selvatico (WT) (cioè, di riferimento o negativi). I dati raccolti per tutte le varianti somatiche del campione, non solo per le mutazioni clinicamente significative, possono essere utilizzati. I dati possono essere aggregati per tipo di campione, tipo di tessuto, tipo di variante, variante, gene o esone, cambiamento di aminoacido, frazione allelica della variante (VAF) prevista (compresi intervallo, media, mediana, deviazione standard e coefficiente di variazione espresso in percentuale), numero di chiamate positive sul totale delle chiamate e tasso di chiamate positive con intervallo di confidenza al 95% a due lati.

Il laboratorio deve stabilire LoD per VAF per le inserzioni e/o le delezioni (indel) e le varianti a singolo nucleotide (SNV), le letture chimeriche per le fusioni geniche e i numeri di copie per le amplificazioni o le perdite per tutti i tipi di varianti. In alternativa, il livello minimo di acido nucleico e il livello minimo di contenuto tumorale possono essere stabiliti. L'Appendice C fornisce esempi pratici di casi d'uso per stabilire la LoD.

La determinazione di LoB consente di distinguere i segnali dal fondo nelle applicazioni somatiche NGS. Per determinare il LoB, il laboratorio deve analizzare campioni bianchi (ad esempio, campioni variante-negativi), eseguiti al livello più alto di DNA. L'Appendice C fornisce esempi pratici di casi d'uso per stabilire LoB.

MM09 conferma che la progettazione, lo sviluppo e il funzionamento dei metodi NGS rimangono impegnativi, poiché i requisiti normativi sono vaghi e la maggior parte dei documenti di orientamento si concentra sulla descrizione dei requisiti senza fornire istruzioni dettagliate su come tradurli in pratica. Nel 2018, il College of American Pathologists (CAP), con la rappresentanza dell'Association for Molecular Pathologists (AMP), ha riconosciuto la necessità di modernizzare la

guida e ha creato una serie di fogli di lavoro strutturati che guidano l'utente attraverso l'intero ciclo di vita di un metodo NGS (con particolare attenzione alle applicazioni germinali).⁷³ Il set iniziale è stato successivamente perfezionato e ampliato a sette fogli di lavoro grazie a una collaborazione con Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), che li ha incorporati nella propria linea guida MM09. La NGS clinica continua a evolversi rapidamente e, data la diversità dei metodi, i fogli di lavoro sono stati intenzionalmente progettati per fornire concetti ed esempi didattici che riflettono le applicazioni NGS comunemente utilizzate piuttosto che standard di prestazione prescrittivi.

I fogli di lavoro contengono la descrizione di metriche per la validazione e il controllo di qualità, affiancate ai requisiti di accreditamento fissati dal programma del College of American Pathologists.

Alcuni esempi di metriche presentate nei fogli di lavoro per la validazione:

A) Rilevamento delle varianti	B) Prestazioni in condizioni e attrezzature diverse	C) Altre metriche
Accordo percentuale positivo	Precisione	Limite di rilevamento
Accordo percentuale negativo	Precisione - Ripetibilità	Interferenza
Valore predittivo positivo tecnico	Precisione - Riproducibilità	Reattività incrociata
Precisione	Robustezza / Banda di protezione	Intervallo di segnalazione
Tasso di falsi negativi		Intervallo di riferimento
Tasso di falsi positivi		

Altre metriche sono previste nei fogli di lavoro per il controllo di qualità:

CQ PREESAME (per campione)	ESAME CQ (per ogni sessione)
Qualità del campione	CQ del ciclo strumentale
Tipo di campione errato	Densità del gruppo (cluster) 865-965 k/mm ²
Tipo di provetta errato	Qualità di base Q30 ≥ 75%
Quantità insufficiente	CQ del flusso dati
Coagulazione (solo sangue)	Lecture totali che passano il filtro > 6 Gb
Etichettatura insufficiente	% di lecture non assegnate a nessun campione < 5%
Campione scaduto	
Provetta di raccolta scaduta	

⁷³ Santani A, Simen BB, Briggs M, et al. Designing and Implementing NGS Tests for Inherited Disorders: A Practical Framework with Step-by-Step Guidance for Clinical Laboratories. J Mol Diagn. 2019;21(3):369-374. doi:10.1016/j.jmoldx.2018.11.004

Qualità e quantità del DNA Rapporto OD 260/280 >1.7 Analisi elettroforetica Quantificazione >= 500 ng	Campioni di controllo Controllo senza modello <500 letture allineate al bersaglio Controllo positivo Varianti attese trovate
CQ d'ESAME (per campione)	
Preparazione della libreria Dimensione e distribuzione dei frammenti >50% di frammenti tra 200 e 1000 bp Concentrazione della libreria >4 nM	Chiamata e annotazione di varianti Rapporto Ti/Tv (per esoma o genoma) >2,0
Separazione dati (de-multiplexing) del campione % di letture assegnate al campione 8-14%	Verifica del campione Conferma dell'identità del campione mediante un approccio di genotipizzazione indipendente >95% delle posizioni analizzate sull'array QC
Allineamento delle letture % Letture allineate al bersaglio >90% Copertura media del bersaglio >100X Distribuzione della copertura >95% entro 20-200X	Integrità del trasferimento dei dati Trasferimento dei dati alla nuvola Corrispondenza del checksum FASTQ prima e dopo il trasferimento al deposito nuvola

Accredia su prestazioni dei metodi

Accredia nel suo Regolamento per i laboratori medici⁷⁴ al punto 7.3.1 (Generalità) chiede che nel caso di carenza di informazioni in merito a caratteristiche prestazionali riportate nelle istruzioni per l'uso, o di assenza di informazioni documentate rese da chi ha prodotto/sviluppato il metodo, le caratteristiche prestazionali rilevanti per l'utilizzo previsto vanno determinate dal laboratorio.

Per il punto 7.3.2 (Verifica dei metodi d'esame) si fa notare che al fine di poter confrontare le prestazioni del laboratorio con quelle specificate dal produttore o dal metodo, è importante che la statistica e la terminologia siano le medesime.

Al punto 7.3.3 (Validazione dei metodi d'esame) si chiede che tra i metodi soggetti a validazione rientrano i metodi interni (vedi definizione par. 3), pertanto inclusi quelli dichiarati dal fabbricante ad uso di ricerca (RUO), qualora utilizzati dal laboratorio a scopo diagnostico.

⁷⁴ Accredia RT-35 Prescrizioni per l'accreditamento dei Laboratori Medici - UNI EN ISO 15189:2023. versione 02

Nel Regolamento Accredia ora vigente il termine “Metodo di esame IVDR” sostituisce l’espressione precedentemente usata “procedura di esame riconosciuta”.

Procedure di validazione appropriate sono quelle basate su protocolli riconosciuti, cioè, ove esistenti, definiti da organizzazioni scientifiche di riferimento (es. CLSI, IFCC, EFLM), e/o normati (es. ISO 21474-2 per i test molecolari multiplex per gli acidi nucleici).

Il Laboratorio che richiede l'accreditamento, con campo fisso, di esami eseguiti secondo metodi interni, deve inviare ad ACCREDIA copia di tali metodi, accompagnati dalla dichiarazione di validazione e idoneità (sintesi delle registrazioni previste al §7.3.3.e) della norma). Ogni revisione deve essere inviata ad ACCREDIA; qualora il Laboratorio non faccia pervenire ad ACCREDIA tale documentazione, i relativi esami saranno esclusi dall'accreditamento.

Nel caso di accreditamento flessibile, per gli esami eseguiti secondo metodi interni, ACCREDIA si riserva di chiedere copia di tali metodi e delle relative dichiarazioni di validazione e idoneità (sintesi delle registrazioni previste al §7.3.3 punto e) della norma).

Verifica dei metodi d'esame (punto 7.3.2)

ISO 15189 chiede di verificare la capacità di eseguire correttamente i metodi di esame prima di introdurli nell'uso, assicurando che le prestazioni richieste, come specificato dal produttore o dal metodo, possano essere raggiunte.

L'estensione della verifica richiesta deve essere sufficiente per la validità dei risultati pertinenti al processo decisionale clinico. Personale con l'autorizzazione e la competenza appropriate deve esaminare i risultati della verifica e registrare se i risultati soddisfano i requisiti specificati.

Se un metodo viene rivisto dall'organismo emittente, il laboratorio deve ripetere la verifica.

Devono essere conservate le registrazioni con le specifiche di prestazione da raggiungere, i risultati ottenuti e una dichiarazione che attesti se le specifiche di prestazione sono state raggiunte e, in caso contrario, le azioni intraprese.

NOTA. Periodicità delle verifiche

Una verifica non è per sempre. ISO 15189 chiede in molti punti che le risorse e l'organizzazione del laboratorio vengano sottoposti a revisione periodica. Al punto 4.3 si chiede la revisione di appropriatezza degli esami. Al punto 6.2.4 si chiede la revisione del programma di formazione. Al 6.3.2 si prevede la revisione dei controlli sulla struttura fisica, al 6.7.1 degli accordi con gli utenti. Al 7.2.4.1 si chiede la revisione delle regole per i prelievi, al 7.2.5 i sistemi per il trasporto dei campioni. Al punto 7.3.1 si rivedono i metodi di esame in relazione all'uso clinico, come al 7.3.5 gli intervalli di riferimento. Al punto 7.3.7.4 (ripreso più avanti) la comparabilità tra metodi diversi. Ancora, al punto 7.8 si rivede il piano delle emergenze, al punto 8.3.2 tutti i documenti, al punto 8.8.2 gli indicatori di qualità.

Valutazione dell'incertezza di misura (punto 7.3.4)

a) La MU dei valori delle quantità misurate deve essere valutata e mantenuta per l'uso previsto, se pertinente. La MU deve essere confrontata con le specifiche di prestazione e documentata. La NOTA ISO/TS 20914 fornisce dettagli su queste attività ed esempi. b) Le valutazioni della MU devono essere riviste regolarmente. c) Per le procedure di esame in cui la valutazione della MU non è possibile o

pertinente, deve essere documentata la motivazione dell'esclusione dalla stima della MU. d) Le informazioni sulla MU devono essere messe a disposizione degli utenti del laboratorio su richiesta. e) Quando gli utenti hanno domande sulla MU, la risposta del laboratorio deve tenere conto di altre fonti di incertezza, quali, ma non solo, la variazione biologica. f) Se il risultato qualitativo di un esame si basa su un test che produce dati quantitativi in uscita ed è specificato come positivo o negativo, sulla base di una soglia, la MU nella quantità in uscita deve essere stimata utilizzando campioni rappresentativi positivi e negativi. g) Per gli esami con risultati qualitativi, la MU nelle fasi di misurazione intermedie o nei risultati del CQI che producono dati quantitativi deve essere presa in considerazione anche per le parti chiave (ad alto rischio) del processo. h) La MU deve essere presa in considerazione quando si esegue la verifica o la convalida di un metodo, se pertinente.

NOTA. Guide all'incertezza di misura

ISO/TS 20914 (Laboratori medici - Guida pratica per la stima dell'incertezza di misura) è stata pubblicata per la prima volta nel 2019 a luglio.⁷⁵ Alla fine del periodo di validità e alla luce delle modifiche di ISO 15189, ISO ha considerato la possibilità di una revisione. La votazione formale ha espresso una maggioranza per mantenere il testo come tale. Tuttavia, sono state discusse nel corso del 2023 alcune criticità non trascurabili.⁷⁶ Ad esempio, l'incertezza del calibratore, la definizione degli scenari di singoli esempi, il trattamento dei risultati qualitativi (nominali e ordinali), il controllo di alcune formule matematiche, contestate in letteratura⁷⁷. Alla fine, ISO ha optato per mantenere il testo del 2019, in attesa di approfondimento delle criticità.

ISO 20914 fornisce una guida pratica per la stima e l'espressione dell'incertezza di misura (MU) dei valori quantitativi prodotti dai laboratori medici, ma anche dei valori quantitativi prodotti vicino alla soglia decisionale medica dai sistemi point-of-care, nonché i risultati prodotti da metodi qualitativi (nominali) che includono una fase di misurazione. Esclude che MU sia messa con i risultati degli esami, ma dovrebbe essere disponibile su richiesta.

Le misure dei laboratori medici si prestano bene all'utilizzo del controllo di qualità interno (CQI) e di altri dati disponibili per stimare MU senza la necessità di modelli di misurazione e statistiche complesse.

Per un determinato sistema di misura, la stima dell'incertezza estesa dei risultati deve essere confrontata con un limite superiore di incertezza estesa ammissibile basato sulla qualità dei risultati richiesti per uso medico. Tali limiti dovrebbero essere basati sui modelli definiti dalla conferenza di consenso della Federazione Europea di Chimica Clinica e Medicina di Laboratorio (EFLM) del 2014, ovvero studi sugli esiti clinici, variabilità biologica o, quando mancano i primi due modelli, lo stato dell'arte.

Lo scarto tipo (ST) ottenuto da dati di precisione a lungo termine viene definito incertezza standard (u). Se i dati sono stati ottenuti per un periodo sufficiente a includere tutte le variazioni alle condizioni di misurazione, u viene definita u_{Rw} , ovvero l'incertezza standard in condizioni interne al laboratorio. L'incertezza standard, u , moltiplicata per un fattore di copertura k , in genere 2, fornisce

⁷⁵ ISO/TS 20914:2009. Medical laboratories – practical guidance for the estimation of measurement uncertainty. International Organization for Standardization.

⁷⁶ N510 ISO TC212 WG2 discussion summary on the systematic review of ISO TS 20914:2019

⁷⁷ Farrance, I., Frenkel, R. & Badrick, T. (2020). ISO/TS 20914:2019 – a critical commentary. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), 58(8), 1182-1190. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-1209>

un'incertezza estesa U , in modo che $x \pm U$ fornisca un intervallo di copertura che include circa il 95% dei valori possibili per il misurando. L'incertezza di misura standard relativa (u_{rel}) incertezza di misura standard (u) divisa per il valore assoluto del valore della grandezza misurata. Le incertezze relative devono essere utilizzate in due condizioni: quando CV% è approssimativamente costante per una porzione dell'intervallo di misura, oppure quando il misurando è un risultato calcolato e le componenti sono moltiplicate o divise. Con dati sufficienti a costruire il profilo di precisione i dati di confronto delle procedure di misurazione possono essere tracciati utilizzando un diagramma delle differenze, come descritto nel documento CLSI EP09. Oppure i dati di uno studio di imprecisione possono essere utilizzati per creare un profilo di precisione, come descritto nel documento CLSI EP05-A3.

Un laboratorio che usa più di un sistema di misurazione per lo stesso misurando ragionevolmente può stimare una u media, ossia u_{Rw} deve essere stimato separatamente per ciascun sistema di misurazione, per poi calcolare una media comune. Gli scarti sistematici significativi tra diversi sistemi devono essere eliminati.

Non è necessario stimare nuovamente la MU se le prestazioni di CQI e VEQ rimangono all'interno delle specifiche. Una nuova stima serve se c'è stato un cambiamento significativo nel sistema di misurazione o se è stata introdotta una nuova procedura.

Alcune procedure incorporano una fase che genera un valore confrontato con un limite di soglia, il cui risultato viene riportato come testo; ad esempio, il prodotto fluorescente rispetto a quello di un calibratore indice, espresso come rapporto, viene riportato come positivo o negativo per l'antigene di superficie dell'epatite B nel siero. Per la stima dell'imprecisione (u_{Rw}) della fase di misurazione, i dati generati dal CQI vengono gestiti nello stesso modo dei risultati quantitativi. Le incertezze estese calcolate possono essere utilizzate per delineare "zone di incertezza" intorno ai limiti negativi/positivi, ad esempio negativo, probabilmente negativo, probabilmente positivo, positivo. In questi casi, non è necessario stimare l'incertezza per valori del segnale di misura diversi da quelli vicini ai limiti decisionali.

I conteggi sono misurazioni, le MU associate al conteggio delle entità devono essere stimate, ad esempio la concentrazione di particolari tipi di cellule del sangue per volume di sangue o il numero di cellule dei tessuti per quantità di campione.

ISO 20914 è corredato di una serie nutrita di appendici di esempio. A.1 - u in condizioni di precisione a lungo termine, A.2.4 Combinazione di incertezze di misura standard indipendenti, A.2.4 Combinazione di incertezze ..., A.2.4 ... incertezze componenti da moltiplicare o dividere, A.3.2 Stima di $u(y)$ utilizzando lotti multipli di reagente, A.3.3 lotti multipli di controllo di qualità interno, A.4 diversi sistemi di misura identici, A.5 anion gap (AG) (alternativa), A.6 stima della velocità di filtrazione glomerulare (eGFR), A.7 globuli bianchi nel sangue intero, A.9 rapporto normalizzato internazionale (INR), A.10 carica virale del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1), A.11 BCR-ABL1 % rapporto su Scala Internazionale (IS), A.12 anticorpi IgG della rosolia (kIU/l - unità arbitrarie), A.13 antigene di superficie dell'epatite B (HbsAg) (S/Co = Valore indice), A.14 globuli rossi e dei globuli bianchi totali nell'urina con metodo manuale (RBC/ μ l WBC/ μ l).

NOTA. Incertezza di misura e risultati qualitativi

Tra le difficoltà incontrate ancora oggi nei laboratori medici, alcune sono dovute alla presenza di

esami con risultati non numerici, ossia qualitativi nominali e ordinali, soprattutto con l'espansione dei settori di genomica molecolare, nel campo delle malattie infettive, tumorali e genetiche propriamente dette. In Germania, l'Associazione medica ha fornito una guida sulla qualità degli esami in medicina di laboratorio⁷⁸, in cui una grossa parte è dedicata agli esami usati per determinare una caratteristica qualitativa, con valori assegnati a una scala senza intervalli ovvero "scala topologica". Le caratteristiche nominali hanno valori non correlati in gerarchia (scala nominale): ad esempio, "rilevabile", "non rilevabile". Le caratteristiche ordinali invece hanno valori correlati in gerarchia (scala ordinale): per esempio, livello del titolo, da + a +++ o il valore del pH su una striscia reattiva.

Recentemente si dispone di linee guida dedicate ai risultati qualitativi, non trattati da ISO 20914 né dal documento originale GUM^{79,80}. EURACHEM ha pubblicato le proprie nel 2021.⁸¹ Il contenuto si articola nei capitoli su valutazione delle prestazioni del metodo qualitativo, 3.2 Quantificazione delle prestazioni, 3.3 Valutazione dei tassi di falsi positivi e falsi negativi, 3.4 Limite di rilevamento e selettività, 4 Espressioni di confidenza, 4.2 Rapporto di probabilità, 4.3 Probabilità a posteriori, 4.4 Affidabilità delle metriche, 4.5 Incertezza delle proporzioni. Si aggiungono alcuni esempi come identificazione di composti mediante spettrometria di massa a bassa risoluzione, identificazione di composti purificati mediante spettrometria a infrarossi, identificazione di droghe d'abuso nelle urine mediante tecnica immunoenzimatica moltiplicata (EMIT) e una tecnica alternativa, identificazione del gene SRY umano in materiale biologico mediante qPCR, identificazione di residui di pesticidi negli alimenti mediante GC-MS/MS, identificazione dell'RNA della SARS-CoV-2 mediante amplificazione degli acidi nucleici.

Molti interessi socioeconomici o individuali rilevanti, come la produttività industriale e le condizioni di salute, dipendono dalle prove chimiche. Alcune di queste analisi sono esclusivamente qualitative o prevedono una successiva quantificazione dell'entità chimica identificata.

Esiste un'ampia varietà di metriche per esprimere l'incertezza nei risultati qualitativi. Tuttavia, il consenso su quali metriche utilizzare è limitato. Ad eccezione di epidemiologia e laboratorio medico, dove i concetti di "sensibilità clinica" e "specificità clinica" sono costantemente utilizzati come parametri di accuratezza clinica. I risultati ordinali possono essere ridotti a risultati binari (sì/no) e trattati con i metodi di EURACHEM, assegnando i risultati della classificazione ordinale come "corretti" o "non corretti". Altri metodi per trattare le scale ordinali non rientrano nell'ambito di questa guida. La Guida EURACHEM/CITAC dichiara infatti di non trattare tutti gli strumenti disponibili per la valutazione delle prestazioni dei metodi qualitativi. Non considera, ad esempio, la concordanza tra metodi qualitativi o il trattamento delle scale ordinali.

EURACHEM tratta la valutazione e l'espressione della semplice classificazione in due classi

⁷⁸ Revision of the "Guideline of the German Medical Association on Quality Assurance in Medical Laboratory Examinations – Rili-BAEK" (unauthorized translation) Laboratoriums Medizin, vol. 39, no. 1, 2015, pp. 26-69.

⁷⁹ JCGM, Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement (JCGM 100:2008), Sèvres: BIPM, 2008.

⁸⁰ ISO/IEC, Uncertainty of measurement – Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995)(ISO/IEC Guide 98-3), Geneva: ISO, 2008.

⁸¹ da Silva RB, Ellison SLR, editors. Eurachem/CITAC guide: assessment of performance and uncertainty in qualitative chemical analysis. 1st Ed. Teddington (United Kingdom): Eurachem; 2021: 49 p.

("classificazione binaria"). Il modo più elementare per quantificare le prestazioni di un metodo qualitativo è il calcolo dei tassi di risultati falsi. Con risultati "positivi" o "negativi", è utile riportare rispettivamente i tassi di "vero positivo" e "falso positivo" o "vero negativo" e "falso negativo". Il tasso di falsi positivi è la frazione di casi negativi che vengono falsamente segnalati come positivi (fp/nc), dove fp e nc sono rispettivamente i numeri di risultati falsi positivi e di casi negativi, ma anche la frazione di risultati positivi falsamente segnalati come positivi (fp/p), dove p è il numero di risultati positivi. L'efficienza dell'esame è definita come la frazione di qualsiasi tipo di risultati corretti rispetto a tutti i risultati (cioè, $(tp + tn)/(p + n)$). L'indice di Youden è un metodo alternativo per quantificare il successo dei risultati, ovvero $Y ((TP(\%) + (TN(\%) - 100.))$.

EURACHEM aggiunge che per il risultato qualitativo basato sulla valutazione di una caratteristica quantitativa, la selezione dei criteri di classificazione che bilanciano i tassi di risultati veri e falsi, tipicamente TP e FP, può essere effettuata utilizzando le curve ROC (Receiver Operating Characteristic), che tracciano la coppia (TP, FP) al variare di un criterio di classificazione (cioè di una soglia di discriminazione).

La forma più familiare e ampiamente utilizzata per riportare le prestazioni dell'analisi qualitativa è il tasso di risultati falsi, in particolare FP e FN o i loro tassi complementari, TN e TP. Due di questi tassi possono essere combinati nella stessa caratteristica: il rapporto di verosimiglianza, LR [quoziente di probabilità]. Se viene riportato un risultato positivo, $LR(+)$ è stimato come $LR+ = TP/FP$.

FP e FN possono essere stimati direttamente dal numero di risultati falsi di una serie di risultati. L'esame qualitativo basato esclusivamente su segnali strumentali qualitativi, questo è l'unico modo per stimare l'incertezza. Tuttavia, se le risposte false sono poco frequenti, questo approccio richiede un numero elevato di risultati. Un'alternativa sono gli studi di disallineamento casuale nelle banche dati di riferimento, come le banche dati degli spettri di massa o degli spettri infrarossi.

Infine, il risultato qualitativo basato su un criterio di classificazione quantitativa per i risultati quantitativi (come un metodo di analisi strumentale), i modelli della dispersione dei risultati possono essere utilizzati per stimare i tassi di risultati veri e falsi. Molti esami di conferma o di rilevamento mostrano una forte dipendenza da qualche variabile continua. La regressione logistica e la regressione probit sono comunemente applicate a tali problemi e sono state proposte per la valutazione dei metodi qualitativi. La regressione logistica è stata usata ad esempio nel rilevamento del DNA a basso numero di copie.

Ma anche, quando non sono disponibili dati sulle prestazioni del metodo da parte di terzi e non è possibile valutare le prestazioni esclusivamente attraverso la sperimentazione o la modellazione, si può utilizzare l'esperienza pratica nella classificazione per decidere se il metodo è adatto all'uso previsto.

Per un'analisi esclusivamente qualitativa, LOD può essere trovato applicando la misura a campioni contenenti livelli progressivamente più piccoli della caratteristica fino a quando la probabilità di produrre risultati falsi raggiunge un criterio prestabilito. Anche la regressione logistica e probit può essere utilizzata per questo tipo di valutazione.

Sebbene il tasso di falsa risposta possa essere misurato per ogni diverso materiale o per ogni specie influente presente, è improbabile che gli studi di selettività generino un unico valore definitivo per la selettività.

Con informazioni affidabili sulla prevalenza di una particolare caratteristica (per esempio, una una

prevalenza ben documentata di una particolare malattia), LR+ associato a un risultato può essere convertito nella probabilità a posteriori PP che l'elemento testato sia positivo, dato il risultato positivo del test. Questa viene stimata utilizzando il teorema di Bayes.

EURACHEM quindi estende la guida alla qualità statistica del tasso di risultato stimato, che dipende dal numero di risultati utilizzati per la sua determinazione, e può essere espressa come un intervallo di confidenza, CI, per il tasso calcolato. Questo intervallo di confidenza è noto anche come "incertezza di condizione" e viene tipicamente calcolato per il livello di confidenza del 95% (95 % CI).

Va però evidenziato che questa incertezza non riguarda i risultati degli esami, ma i parametri delle prestazioni. Si tratta quindi di un secondo livello, proprio come l'incertezza standard espressa come scarto tipo può avere a sua volta un intervallo di confidenza.

Sono state segnalate alcune criticità della Guida EURACHEM: in particolare la mancanza della componente di precisione (basata sulla ripetizione delle misure) e l'ambiguità tra risultati qualitativi e passi intermedi con misure quantitative.⁸² Nella Guida EURACHEM non c'è alcuna caratteristica derivante dalle ripetizioni delle misurazioni. Tutte le caratteristiche esposte dalla Guida derivano dal confronto dei risultati con un riferimento esterno al metodo di laboratorio.

Invece, in ISO 3534-2 3.3.4, VIM 2.15 e ISO Guide 99 la "precisione" è definita come il grado di accordo tra i risultati di prove/misure indipendenti ottenuti da misure ripetute su oggetti uguali o simili. Secondo VIM 2.28, la precisione deriva dai valori ottenuti in condizioni come quelle di ripetibilità, di precisione intermedia e di condizione di riproducibilità. L'uso della parola "precisione" come sinonimo di "valore predittivo positivo", come viene fatto da EURACHEM in più occasioni, introduce un'ambiguità non necessaria e fortemente pericolosa.

EURACHEM ignora del tutto la soluzione fissata da ISO 20914 per i metodi che per ottenere un risultato finale qualitativo passano attraverso una o più fasi di misura quantitativa.

ISO ha invece pubblicato il documento ISO/TR 27877, dedicato proprio all'analisi statistica per la valutazione della precisione dei metodi di misura binari e dei loro risultati.⁸³ Il documento ISO raccoglie diversi approcci alla precisione, tra cui quello della "conformità e concordanza". In un certo senso, per semplificare, la "concordanza" corrisponderebbe alla ripetibilità dei risultati quantitativi, la "concordanza" alla riproducibilità tra laboratori.

ISO 20914 ha messo in primo piano la stima della precisione per arrivare all'incertezza. ISO 27877 descrive alcune alternative per la valutazione della precisione dei metodi di misura binari e dei loro risultati: il metodo basato sulla norma ISO 5725, l'approccio concordanza e concordanza, ORDANOVA (precisione della misurazione su scala ordinale), accuratezza del CM (percentuale di valori misurati corretti), coefficiente Kappa (rapporto tra l'accuratezza del CM meno la possibilità che la correttezza si verifichi per caso e uno meno la possibilità che la correttezza si verifichi per caso).

⁸² Pradella M. Criticalities of Eurachem/CITAC Guide Uncertainty of Qualitative results, Measurement, 2022, 110911, ISSN 0263-2241,

⁸³ ISO/TR 27877:2021 Statistical analysis for evaluating the precision of binary measurement methods and their results. Geneva (Switzerland): International Organization for Standardization; 2021: 26 p.

*SIPMeL ha già raccolto molte indicazioni nelle Raccomandazioni Q16 sull'incertezza di misura.^{84, 85}
Come suggerito da ISO/TS 16393:2019, la componente della precisione della misura per risultati di
tipo qualitativo nominale si ottiene come frequenza dei risultati positivi per un materiale di
controllo di qualità interno in un periodo di tempo lungo, a un livello vicino alla soglia di*

⁸⁴ SIPMeL. Q16. Raccomandazioni per la stima dell'incertezza di misura nei laboratori medici (ISO 15189 e ISO 20914).

⁸⁵ Pradella M. Alcune certezze dell'incertezza di misura: nuova ISO 20914 e raccomandazioni SIPMeL. Riv Ital Med Lab 2021 Sep 15. DOI: 10.23736/S1825-859X.21.00112-2.

positività.⁸⁶ Ai risultati qualitativi nominali ottenuti da segnali o indici quantitativi numerici si attribuisce l'incertezza di questi ultimi, ma solo intorno al livello soglia. Analogamente, per i risultati ordinali (+, 2+, 3+) è utile stimare l'incertezza solo al livello soglia tra negativo e positivo.

Accredia su Valutazione dell'incertezza di misura

Accredia nel suo Regolamento per i laboratori medici⁸⁷ al punto 7.3.4 (Valutazione dell'incertezza di misura) chiede che la comunicazione dell'incertezza di misura al richiedente deve contenere anche il livello di **fiducia** associato e il **fattore di copertura** utilizzato. È generalmente accettato usare un fattore di copertura $k = 2$, corrispondente ad un livello di fiducia del 95%. Esempio di dichiarazione del livello di fiducia e del fattore di copertura utilizzato: "L'incertezza riportata nel presente documento è l'incertezza estesa ed è ottenuta moltiplicando l'incertezza tipo composta per un fattore di copertura $k = 2$, che per una distribuzione normale porta ad un livello di confidenza approssimativamente del 95%".

Comparabilità dei risultati degli esami (punto 7.3.7.4)

Il tema della comparazione di metodi (7.3.7.4), che in ISO 15189 viene collocato tra le attività per il monitoraggio dei risultati, viene invece incluso in questo documento per le ragioni illustrate più avanti. 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. Alternative per il confronto dei 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

⁸⁶ ISO/TS 16393:2019. Molecular biomarker analysis – Determination of the performance characteristics of qualitative measurement methods and validation of methods. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2019.

⁸⁷ Accredia RT-35 Prescrizioni per l'accreditamento dei Laboratori Medici - UNI EN ISO 15189:2023. versione 02

⁸⁸ Joint Commission for Guides in Metrology (JCGM) International vocabulary of metrology —

[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).

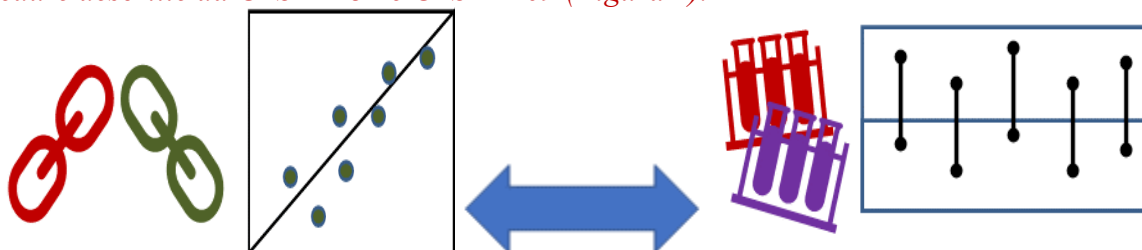


Figura 2. Schema della comparabilità dei risultati (a sinistra) e della compatibilità dei risultati (a destra) secondo VIM

NOTA. Guide al confronto dei metodi

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 (EQA) 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

Basic and general concepts and associated terms (VIM) 3rd edition.

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.

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 in pool 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 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

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

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

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 t per dati accoppiati.⁹⁷ 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.

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(1-2):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.

NOTA. Confronto metodi secondo guida CLSI e Raccomandazione SIPMeL

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 rigore scientifico 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.

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

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 3 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>

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 (verifiche), non con il punto 7.3.7 (controlli).¹⁰³

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

Conclusioni e raccomandazioni

Questo documento di Raccomandazioni non sostituisce la norma originale UNI EN ISO.

I vertici ISO chiedevano a ISO 15189 di 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. Ne risulta la presenza nel testo della norma di alcuni riferimenti ad altri documenti ISO, la cui consultazione diventa ineludibile. La direttiva non è stata però applicata in modo perfetto, alcuni riferimenti mancano e vanno integrati. Ad esempio, mancano i riferimenti a ISO 22583 per gli strumenti dei servizi POCT. Vanno inoltre considerati diversi documenti CLSI, per la declinazione applicativa dei principi poco prescrittivi di ISO 15189. Senza i riferimenti ad altri documenti ISO e i documenti CLSI i laboratori possono incontrare difficoltà ad adeguarsi ai requisiti 15189 e gli ispettori di accreditamento possono a loro volta trovarsi in imbarazzo per la verifica delle evidenze.

Queste Raccomandazioni mettono in evidenza alcuni aspetti critici: l'appartenenza al capitolo "metodi" sia dei paragrafi dedicati alla "tracciabilità" che quelli della "comparabilità dei risultati", che la norma ISO colloca altrove; le fonti da cui trarre le specifiche dei metodi; le guide applicative sulle prestazioni dei metodi, in particolare quelli molecolari e NGS; la periodicità delle verifiche; l'approccio pragmatico all'incertezza di misura; l'approccio altrettanto pragmatico alla comparabilità dei risultati degli esami.

Si possono quindi esprimere le seguenti Raccomandazioni:

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.	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.
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".	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'.
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).	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).
4. Si raccomanda ai laboratori di avvicinarsi ai requisiti di ISO 15189:2022 anche prima di avviare un percorso di accreditamento con un	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

organismo che operi in conformità alla norma 7 ISO/IEC 17011. 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". 6. Taratura e validazione nonché verifica dei metodi possono essere descritte nella stessa documentazione 7. La documentazione può denominare la proprietà data dalla catena ininterrotta di tarature come "tracciabilità" 8. La Raccomandazione SIPMeL Q16 fornisce indicazioni per le proprietà dei metodi con risultati qualitativi o qualitativi discreti nonché ordinali 9. I metodi che non consentono una tracciabilità metrologica devono avvalersi in alternativa dei risultati dei programmi di VEQ come indicatori dei requisiti di esattezza. 10. La certificazione dei materiali di riferimento è ottenuta dai laboratori di riferimento (distinti dai laboratori di referenza) accreditati con ISO 15195. 11. Il riferimento normativo per la tracciabilità metrologica è dato da ISO 17011 ma anche da ISO 21151, che contiene i requisiti per i protocolli internazionali di armonizzazione 12. Per la tracciabilità metrologica degli esami di genomica si raccomandano le guide CLSI MM01, MM09, MM17, MM20, MM21 13. Per la tracciabilità dei metodi con risultati qualitativi si raccomanda la guida CLSI EP12	ISO/IEC 17011. 5. Calibration and validation as well as verification of methods can be described in the same documentation 6. 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'. 7. The documentation may name the property given by the unbroken chain of calibrations as 'traceability'. 8. SIPMeL Recommendation Q16 provides guidance for the properties of qualitative methods or with discrete qualitative or ordinal results 9. Methods that do not allow for metrological traceability must alternatively use the results of VEQ programmes as indicators of trueness requirements. 10. Certification of reference materials is obtained by reference laboratories (as distinct from referral laboratories) accredited with ISO 15195. 11. The normative reference for metrological traceability is given by ISO 17011 but also by ISO 21151, which contains the requirements for international harmonization protocols 12. CLSI Guides MM01, MM09, MM17, MM20, MM21 are recommended for the metrological traceability of genomics tests 13. For the metrological traceability of methods with qualitative results, CLSI Guide EP12 is recommended 14. For the metrological traceability of methods with visual reading results, the laboratory
--	--

14. Per la tracciabilità metrologica dei metodi con risultati a lettura visiva il laboratorio collabora con il fabbricante 15. Il laboratorio distingue tra principio, metodo, modello e procedura della misurazione, ovvero dell'esame. 16. Le caratteristiche dei metodi con amplificazione degli acidi nucleici fanno riferimento a ISO 17822 e ai diversi documenti CLSI citati da ISO. 17. Le caratteristiche prestazionali degli esami vengono periodicamente rivalutate. 18. Per la verifica della precisione il laboratorio applica almeno le indicazioni di CLSI EP15. 19. Per la verifica dello scarto sistematico (esattezza), il laboratorio applica almeno le indicazioni di CLSI EP15. 20. Se le circostanze lo consentono, il laboratorio verifica il metodo in modo semplificato seguendo la procedura di CLSI EP10, eventualmente in collaborazione con il fabbricante. 21. Per la verifica dei limiti di rilevazione, del bianco e di quantificazione, il laboratorio applica almeno le indicazioni di CLSI EP17. 22. Per i metodi che ottengono un risultato finale in seguito ad una sequenza complessa di passaggi e misurazioni, come quelli MPS/NGS, il laboratorio in collaborazione con il fabbricante utilizza le metriche disponibili, come quelle descritte da ISO 20397-2 e CLSI MM09. 23. L'incertezza dei risultati viene stimata seguendo la guida ISO 20914, a partire dai dati del controllo di qualità interno. 24. Come indica ISO 20914, l'incertezza dei metodi che usano fasi di misurazione	co-operates with the manufacturer 15. The laboratory distinguishes between the principle, method, model and procedure of measurement, i.e. examination. 16. The characteristics of nucleic acid amplification methods refer to ISO 17822 and the various CLSI documents cited by ISO. 17. The performance characteristics of the examinations are periodically reassessed. 18. For the verification of precision, the laboratory applies at least the indications of CLSI EP15. 19. For the verification of systematic deviation ("trueness"), the laboratory shall apply at least the guidelines of CLSI EP15. 20. If circumstances permit, the laboratory shall verify the method in a simplified manner following the procedure of CLSI EP10, possibly in collaboration with the manufacturer. 21. For the verification of the limits of detection, blank and quantification, the laboratory shall apply at least the indications of CLSI EP17. 22. For methods that obtain a final result following a complex sequence of steps and measurements, such as MPS/NGS, the laboratory in collaboration with the manufacturer shall use available metrics, such as those described by ISO 20397-2 and CLSI MM09. 23. The uncertainty of the results is estimated according to ISO 20914, from internal quality control data. 24. As ISO 20914 states, the uncertainty of methods that use quantitative measurement steps to arrive at qualitative nominal results
--	---

quantitativa per arrivare a risultati nominali qualitativi viene stimata per le fasi quantitative. 25. L'incertezza di misura per risultati nominali qualitativi viene stimata in base alle guide EURACHEM, ISO 27877, ISO 16393 e SIPMeL Q16 26. 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.	is estimated for the quantitative steps. 25. The measurement uncertainty for qualitative nominal results is estimated according to EURACHEM, ISO 27877, ISO 16393 and SIPMeL Q16 guides 26. 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.
---	---