

LA METROLOGIA NEI LABORATORI MEDICI

Marco Pradella

Validità fondazionale dei metodi per Next Generation Sequencing (NGS)

Quale incertezza nella profilazione del DNA?

FOUNDATIONAL VALIDITY OF NGS METHODS

NGS are used in Italy by some ISO 15189-accredited medical laboratories, in addition to others that are not accredited, while in Europe it is about 10 percent of molecular examinations. Determining whether a given allele is present in a DNA is arrived only at the end of a complex measurement process with quantitative steps. ISO 20397-2 provides many quality metrics for MPS/NGS and parallels an extensive literature and FDA regulations. NGS are not exempt from estimating the precision and uncertainty of the measurements from which they are derived.

RIASSUNTO

I metodi NGS sono usati in Italia da alcuni laboratori medici accreditati ISO 15189, oltre ad altri non accreditati, mentre in Europa rappresentano circa il 10% degli esami molecolari. A stabilire se un dato allele è presente in un DNA, si arriva solo al termine di un processo di misura complesso, con fasi quantitative. ISO 20397-2 fornisce molte metriche di qualità per MPS/NGS e si affianca a una vasta letteratura e disposizioni FDA. I metodi NGS non sono esentati dalla stima di precisione e incertezza delle misure da cui derivano.

METODI PER SEQUENZIAMENTO MASSIVO PARALLELO (MPS) O NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

Nella banca dati Accredia si vedono ora nove laboratori medici accreditati in Italia con ISO 15189 per metodi di sequenziamento di nuova generazione (NGS). Possiamo ritenere che quelli non accreditati per questi metodi siano molti di più, quindi il tema giustamente merita l'attenzione dedicata da FDA, CEN, ISO e SIPMeI, in particolare per le conseguenze sulle procedure di accreditamento ISO.

Il sequenziamento massivo parallelo (MPS) o *Next Generation Sequencing* (NGS) è una tecnologia innovativa e altamente versatile che permette il sequenziamento in parallelo di milioni di frammenti di DNA e consente di eseguire contemporaneamente la ricerca di molteplici geni, con una resa diagnostica superiore al sequenziamento tradizionale, accorciando drasticamente i tempi. La nuova tecnologia si sta diffondendo rapidamente nei laboratori anche in Italia, anche in campo

pediatrico, per le malattie infettive ed ematologiche, e sta progressivamente sostituendo i metodi tradizionali molecolari, persino quelli di citogenetica, nonché quelli in ambito forense. Questi metodi hanno segnato una svolta rivoluzionaria nella possibilità di caratterizzare genomi di grandi dimensioni rispetto al metodo di sequenziamento del DNA di prima generazione (sequenziamento Sanger), grazie alla potenzialità di produrre, in un'unica seduta, una quantità di informazioni genetiche milioni di volte più grande. Nel 2023 NGS rappresentava in Europa circa il 10% degli esami di patologia molecolare.

METROLOGIA DEI METODI DI PROFILAZIONE DEL DNA

"Validità fondazionale" significa che un metodo può essere affidabile. La "validità fondazionale" richiede che si dimostri, su base empirica, che il metodo sia ripetibile, riproducibile e accurato a livelli misurati e appropriati per l'uso che se ne intende fare. Si ritiene

che corrisponda al requisito giuridico della Federal Rule 702(c) di "metodi e principi affidabili".

"Validità in campo" significa, invece, che il metodo è stato correttamente applicato, e si ritiene corrisponda al requisito giuridico della Federal Rule 702(d), ovvero che un esperto "abbia applicato in modo affidabile principi e metodi ai fatti relativi al caso".

Ferrero e Scotti hanno lucidamente dimostrato come la validità fondazionale dei metodi di profilazione del DNA (già trattata in un rapporto PCAST) sia un contributo importante all'incertezza di definizione.

Nel caso degli esami di genomica, quando si deve stabilire se un dato allele è presente in un profilo di DNA, si arriva solo alla fine di un processo di misura complesso, che implica misure quantitative.

METROLOGIA DEI METODI MPS/NGS: ISO 20397-2

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 spesso venga 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

Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio, Commissione Nazionale Qualità e Accreditamento, Castelfranco Veneto (TV)
labmedico@labmedico.it

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 gli indicatori di qualità delle chiamate di varianti.

Dati grezzi (capitolo 4): a ciascun nucleotide di una sequenza dev'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 di singola estremità (punto 5.3.1.2) e per le 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 d'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.

STRUMENTI NORMATIVI PER LA QUALITÀ DEI RISULTATI NGS

ISO 20397-2 non è per niente isolato. Un contributo molto autorevole sui metodi NGS viene proprio da U.S. Food and Drug Administration (FDA), dove si afferma la necessità di documentare un insieme minimo di parametri (ad esempio, accuratezza, precisione, limite di rilevamento – LoD). Va dimostrata l'accuratezza misurando la percentuale di accordo positivo (PPA) e negativo (NPA) e il valore predittivo tecnico positivo (TPPV). FDA ne illustra esempi significativi nell'Appendice A del suo documento. Analogamente si valuta la precisione (riproducibilità e ripetibilità) sia per le chiamate di varianti sia per le chiamate di tipo "selvaggio" (*wild type*). La riproducibilità

per gli esami NGS implica la misurazione variando alcune condizioni specifiche (come l'utilizzo di operatori diversi, condizioni operative diverse, giorni di misurazione diversi, strumenti diversi), utilizzando lo stesso campione (compresi i campioni intorno al valore soglia). La ripetibilità prevede la misurazione della variabilità dei risultati quando si utilizzano gli stessi operatori, lo stesso sistema di misurazione, le stesse condizioni operative e lo stesso luogo e si replicano le misurazioni sugli stessi oggetti o su oggetti simili in un breve periodo di tempo.

Le Raccomandazioni SIPMeL per la stima dell'incertezza di misura nei laboratori medici prendono in considerazione anche i metodi per gli acidi nucleici e pure MPS/NGS. Anche in conformità a ISO 17822, il laboratorio garantisce la qualità degli esami con amplificazione di acidi nucleici sottoponendo a verifica i metodi con etichetta IVD (marchio CE), sottoponendo a validazione e verifica i metodi con etichetta IVD modificati, quelli sviluppati in laboratorio, quelli commercializzati per il solo uso di ricerca, misurando per la verifica le caratteristiche prestazionali di esattezza, intervallo di risposta, intervallo di riferimento (se applicabile), precisione (ovvero incertezza), misurando per la validazione anche limite di rilevazione, interferenze, robustezza, sensibilità e specificità cliniche. Nel caso dei sistemi per sequenziamento massivo parallelo o NGS, il procedimento si applica alla validazione generale della piattaforma, il lavoro non dev'essere ripetuto per i singoli metodi o prove, gli indicatori di qualità utilizzabili sono diversi e specifici per ogni piattaforma.

METODI NGS NEI LABORATORI ACCREDITATI ISO

La preoccupazione di ISO sulla trascurata qualità di MPS/NGS è più che fondata.

La complessità del processo analitico è evidentemente scoraggiante per alcuni laboratori medici. L'espressione del risultato finale in formato qualitativo nominale (o "proprietà classificatoria")

per i metrologi) è purtroppo ingannevole. Si sta formando in realtà un vasto movimento nella comunità scientifica per la definizione delle caratteristiche prestazionali delle proprietà classificatorie o qualitative, incertezza compresa.

Tuttavia, questo non è ancora il caso di MPS/NGS, che infatti giunge al risultato dopo numerose misure quantitative.

ISO 17025 richiede, fin dal 2001, che i laboratori di prova applichino procedure per la stima dell'incertezza e siano in grado, se necessario, di associarla ai risultati restituiti.

Requisito confermato nel punto 7.2.1.1 della ISO 17025:2017, dove si chiedono tecniche statistiche per l'analisi dei dati. La norma aggiunge in una seconda parte (spesso trascurata) il caso in cui *"il metodo di prova preclude una valutazione rigorosa dell'incertezza di misura"*, in cui comunque *"dev'essere fatta una stima basata sulla conoscenza dei principi teorici o sull'esperienza pratica circa le prestazioni del metodo"*.

Questa frase apre a un vasto ventaglio di possibilità. ISO 15189, anche dopo la revisione basata su ISO 17025:2017, discostandosi in una certa misura dalla stessa ISO 17025, si concentra sui processi in cui il risultato qualitativo è ottenuto da una o più misure quantitative.

Scelta a cui si è allineato il documento guida ISO 20914:2019, ora in revisione. Può sembrare una scelta fin troppo restrittiva, che non tiene conto dei metodi dove i risultati qualitativi o classificatori non possono essere associati a misure numeriche.

Tuttavia, per il caso di MPS/NGS la norma ISO attuale e la sua guida 20914 sono del tutto appropriate e sufficienti. La produzione di risultati finali qualitativi nominali (o "proprietà classificatorie") non dovrebbe costituire un comodo rifugio per evitare la stima di precisione e incertezza delle misure da cui derivano.

La complessità dei metodi MPS/NGS non dovrebbe spaventare eccessivamente: il documento ISO 20397-2 fornisce molti indicatori e utili esempi per fare in laboratorio la stima d'incertezza dei metodi NGS.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

– D. Ballard, J. Winkler – J. Galicki & J. Wesoly, Massive parallel sequencing in forensics: advantages, issues, technicalities, and prospects. *Int J Legal Med* 134, 1291-1303 (2020). DOI: 10.1007/s00414-020-02294-0.

– K.M. Elkins, C.B. Zeller. *Next Generation Sequencing in Forensic Science: A Primer*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press; 2021.

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

– ISO 20397-2:2021 *Biotechnology – Massively parallel sequencing – Part 2: Quality evaluation of sequencing data*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2021.

– ISO 17822:2020. *In vitro diagnostic test systems – Nucleic acid amplification-based examination procedures for detection and identification of microbial pathogens – Laboratory quality practice guide*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2020.

– L. Mari: *Toward a harmonized treatment of nominal properties in metrology*. *Metrologia* 54(5), 784-795 (2017).

– National Institute of Justice, *"Embracing Next Generation Methods for Forensic DNA Sequence Analysis"*, November 4, 2019.

– G. Nordin, R. Dybkaer, U. Forsum, X. Fuentes-Arderiu, F. Pontet: *Vocabulary on nominal property, examination, and related concepts for clinical laboratory sciences (IFCC-IUPAC Recommendations 2017)*. *Pure Appl. Chem.* 90(5), 1-23 (2018).

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

– M. Pradella. *Incetenza di misura nei laboratori medici*. *Tutto Misure* 2021 n. 4, pp. 51-53.

M. Pradella. *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).

– President's Council of Advisors on Science and Technology (PCAST): *Report to the President – Forensic Science in Criminal Courts: Ensuring Scientific Validity of Feature – Comparison Methods* (2016).

– A. Senst, A. Caliebe, E. Scheurer, I. Schulz. *Validation and beyond: Next generation sequencing of forensic casework samples including challenging tissue samples from altered human corpses using the MiSeq FGx system*. *J Forensic Sci.* 2022; 67: 1382-1398. DOI: 10.1111/1556-4029.15028.

– A. Soumajit, V. Deepsikha. *Next Generation Sequencing (NGS) – An Advance Approach to Forensic Science: A Review*. *J Forensic Sci & Criminal Inves.* 2023; 16(3): 555938 DOI:10.19080/JFSCI.2023.16.555938.

– U.S. Food and Drug Administration (FDA). *Considerations for Design, Development, and Analytical Validation of Next Generation Sequencing-Based In Vitro Diagnostics Intended to Aim in the Diagnosis of Suspected Germline Diseases*. Updated 13 April 2018.



Marco Pradella è Coordinatore della Commissione Nazionale SIPMeL Qualità e Accreditamento. Componente delle Commissioni tecniche UNI/CT 527 "UNINFO Informatica medica" e

UNI/CT 044 "Tecnologie biomediche e diagnostiche". Già Direttore del Servizio Qualità e prima del Laboratorio ospedaliero nell'Azienda sanitaria di Treviso e Docente di Automazione e Informatica per la Biochimica Clinica e Statistica applicata per la Patologia Clinica nell'Università di Padova.