

ANALISI BIOMEDICALI

Marco Pradella

Incertezza di misura nei laboratori medici

Raccomandazioni SIPMeL per incertezza e precisione di risultati quantitativi e qualitativi

MEASUREMENT UNCERTAINTY IN MEDICAL LABORATORIES

Measurement uncertainty is required for the accreditation of medical laboratories. Documents of the International Organization for Standardization (ISO), as well as various documents of the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), provide guidance for the estimation of uncertainty, both for quantitative and qualitative results. The Recommendations of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (SIPMeL) bring together the sources to facilitate their application.

RIASSUNTO

L'incertezza di misura è richiesta per l'accreditamento dei laboratori medici. Documenti d'International Organization for Standardization (ISO), così come vari documenti del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), forniscono indicazioni per la stima dell'incertezza, sia per risultati quantitativi che qualitativi. Le Raccomandazioni della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) riuniscono le fonti per facilitare la loro applicazione.

INCERTEZZA DI MISURA NEI LABORATORI MEDICI, ACCREDITAMENTO E ISO 20914

Fino ai primi anni del terzo millennio, quasi nessun laboratorio medico si preoccupava dell'incertezza di misura, trovando difficili da capire e applicare le guide ufficiali e non avendo un requisito di accreditamento che la prevedesse, fino alla versione 2012 di ISO 15189. La prima proposta di linea guida applicativa in ambito ISO comparve in un convegno australiano del 2015 e ha prodotto solo nel 2019 un documento finale, ISO/TS 20914.

La revisione della norma di accreditamento ISO 15189 mantiene e rinforza il requisito della stima dell'incertezza, individuando nel documento ISO/TS 20914 le modalità specifiche di applicazione. Tuttavia, non pochi laboratori incontrano ancora difficoltà e la letteratura è ricca di contributi con punti di vista diversi, talora opposti. Nell'inchiesta "Global Measurement Uncertainty Survey" organizzata da Westgard nel 2015, si vide come la maggior parte dei laboratori affermasse di calcolare l'incertezza per gli esami eseguiti, senza però affiancarla ai sin-

goli risultati degli esami di laboratorio. Le principali difficoltà incontrate ancora oggi sono dovute alla presenza nei laboratori medici di molti esami con risultati non numerici, ossia qualitativi nominali e ordinali. Un tipo di esami in costante crescita con l'espansione dei settori di genomica molecolare, sia nel campo delle malattie infettive che tumorali che genetiche propriamente dette. La Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) ha quindi ritenuto di dover produrre un documento di raccomandazioni per l'incertezza di misura nei laboratori medici. Con il documento Q16, SIPMeL raccoglie le principali indicazioni per l'applicazione delle norme ISO, non solo di ISO/TS 20914, della principale letteratura e delle linee guida del *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) per la stima dell'incertezza di misura e il suo utilizzo nella validazione e nella verifica delle procedure di esame.

LE RACCOMANDAZIONI SIPMeL DA ISO 20914, ISO 16393 E DOCUMENTI CLSI

Le Raccomandazioni SIPMeL non trat-

tano le questioni relative all'utilizzo dell'incertezza di misura nei laboratori medici, né le basi statistiche delle stime d'incertezza, nemmeno la discussione sui limiti accettabili per incertezza di misura ed errore (scostamento) totale accettabile, oggetto di recenti contributi in letteratura. Nelle Raccomandazioni si descrive invece la realizzazione pratica delle stime d'incertezza di misura, nonché l'utilizzo della sua componente principale, la precisione, negli audit di parte terza e per l'accreditamento.

Le Raccomandazioni SIPMeL sono divise in 6 capitoli. Nel primo, si conferma l'obbligo per fabbricanti e laboratori di stimare l'incertezza dei metodi, anche in settori particolari come la microbiologia e per i risultati di tipo qualitativo nominale. Contrariamente a quanto richiesto nei laboratori di prova, i laboratori medici non associano la stima d'incertezza a ciascun risultato di esame, ma la rendono disponibile su eventuale richiesta. Infatti, la presentazione dei risultati degli esami nel contesto medico comporta problematiche particolari, che l'aggiunta dell'incertezza contribuirebbe a complicare ulteriormente.

La seconda raccomandazione attribuisce ai fabbricanti il compito della stima d'incertezza per la taratura, in riferimento a ISO 17511. Il laboratorio interviene solo se introduce fattori di correzione per i materiali di taratura. L'esattezza di risultati qualitativi nominali è rappresentata dalla concordanza, ovvero dalla corrispondenza con un esame di riferimento, espressa in termini percentuali.

La terza raccomandazione, aderente a

Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL)
Castelfranco Vento, Treviso
labmedico@labmedico.it

ISO 20914, racconta come ricavare la stima d'incertezza dei dati del controllo interno di qualità in un periodo di tempo lungo, in condizioni stabili del metodo e per valori vicini ai livelli decisionali. Ciò avviene per i risultati quantitativi numerici e allo stesso modo per quelli qualitativi nominali, 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 positività. Ai risultati qualitativi nominali ottenuti da segnali o indici quantitativi numerici si attribuisce l'incertezza di questi ultimi, ma solo intorno al livello soglia.

Con la quarta raccomandazione, alle modalità di espressione per l'incertezza di misura secondo ISO 20914, si affiancano le indicazioni di ISO 16393, che riguardano i risultati qualitativi, e quelle di ISO 19011, che prevedono l'esecuzione di prove in occasione di audit. Varianza e scarto tipo esprimono l'incertezza dei risultati quantitativi numerici, mentre dai risultati qualitativi nominali si ottiene la probabilità di un positivo, stimata dalla sua frequenza. ISO 19011:2018 intende come "evidenza oggettiva" (voce 3.8) i dati che supportano l'esistenza o la veridicità di qualcosa, ottenuti sia da osservazione che da misurazione, prova o con altri mezzi. Nelle ispezioni, in particolare quelle di accreditamento, si realizzano "prove da sforzo", una sorta di "stress test", nella forma di "prove in doppio", o verifiche di ripetibilità, accanto alle prove per la verifica di esattezza. Prove in cui si misurano concretamente capacità e competenze del laboratorio per gli esami campionati in visita. Per valutare i risultati di queste prove si utilizza lo scarto tipo di ripetibilità che compone l'incertezza, quando ciò è possibile. Per risultati qualitativi nominali si utilizza il semplice confronto per identità o differenza dei due risultati.

Anche la quinta raccomandazione riguarda il calcolo dell'incertezza di misura, ovvero per risultati quantitativi numerici lo scarto tipo (σ), convertibile in determinati casi in coefficiente di variazione (CV%) e, se moltiplicato per

un fattore di copertura (k) pari a 2, usato per ottenere l'incertezza estesa (U). Il CV% serve per risultati ottenuti da calcoli con moltiplicazioni o divisioni, comuni nei laboratori medici. Invece per i risultati qualitativi si esprime l'incertezza come la probabilità dei risultati positivi. Esempi di questa tipologia di esami si trovano nel documento Accredia DT-07. Il caso particolare dei risultati qualitativi ordinali (come "+", "++", "+++") è meno complicato di quel che può sembrare. È più facile trovare la soluzione corretta se si evita di usare il termine "semi-quantitativo". Si deve resistere all'impulso di assegnare un valore numerico ai risultati ordinali per poter applicare i calcoli delle variabili continue. Non è necessario avvalersi della teoria completa della precisione per risultati ordinali, ampiamente descritta in letteratura, che prevede di misurare la dispersione combinata per tutti i risultati. Invece, il risultato più vicino ai limiti decisionali, quello debolmente positivo, è di norma il primo positivo, "+". Per questo solo risultato, trascurando tutti gli altri, il laboratorio troverà una probabilità di positivo (POD%) ed eseguirà le verifiche di ripetibilità, così come per tutti i risultati nominali. Infine, la sesta raccomandazione è dedicata ai metodi con amplificazione di acidi nucleici. Per questi sono disponibili documenti ISO (tra gli altri, ISO 17822 e ISO 20397) oltre a numerose linee guida CLSI. Per risultati quantitativi o comunque ottenuti da fasi di misura quantitative, il percorso è quello degli altri metodi del laboratorio medico. La precisione per i risultati qualitativi nominali, senza fasi di misura quantitativa viene studiata al 20% sopra il limite di rilevanza oppure sopra il C_{50} e al 20% sotto (ovvero a C_5 e C_{95}), come in CLSI MM22 e in CLSI MM17. Per un risultato qualitativo, infatti, la concentrazione soglia o C_{50} è quella alla quale il 50% di una grande serie di risultati è positivo.

CONTROLLO INTERNO DI QUALITÀ, PRECISIONE E INCERTEZZA DI MISURA: UNA STESSA FAMIGLIA

Il primo obiettivo delle procedure per

la qualità degli esami è assicurare gli operatori del laboratorio che tutto stia andando abbastanza bene, il metodo è stabile.

Poi viene il resto, come interpretare il significato dei risultati e confrontare metodi diversi. La vasta letteratura disponibile induce alla prudenza nel trarre conclusioni sull'incertezza di misura.

Ad esempio, non è ancora pacifico quali limiti di accettabilità applicare.

Nel laboratorio medico, sotto la pressione della quantità di esami da eseguire e dei tempi di risposta da rispettare, le procedure per la qualità devono essere facilmente eseguibili, semplici, intuitivamente comprensibili, solide, non contestabili. A questo servono ISO 20914 affiancata da una lunga lista di documenti ISO e CLSI. La conoscenza della variabilità ovvero dell'incertezza dell'esame eseguito è necessaria al laboratorio per essere consapevole dell'affidabilità dei propri risultati, ma l'informazione può essere utilmente condivisa con utenti o terze parti, ad esempio nel processo di accreditamento con le prove campionate in visita.

A prescindere dai calcoli sui risultati, due sono gli elementi fondamentali per la componente "precisione" dell'incertezza di misura: la ripetizione e il livello. Servono ripetizioni della misura sullo stesso materiale, ma la stima è fortemente dipendente dal livello della proprietà misurata nel materiale, sia per i risultati quantitativi numerici che ancor più per quelli qualitativi nominali.

I risultati qualitativi nominali talvolta imbarazzano operatori e ispettori di accreditamento, ma la soluzione è più semplice di quanto si immagini: invece di misurare di quanto le osservazioni differiscono dalla media, basta determinare quanto spesso le osservazioni differiscono tra loro. Un concetto analogo si trova ad esempio anche nel NIST Quality Manual for Measurement Services.

Per quanto riguarda infine i metodi per il sequenziamento del genoma, possiamo richiamare le preoccupazioni espresse dal gruppo di O'Rawe nel 2015 e raccolto più recentemente da altri autori, secondo cui c'è bisogno di

Tabella 1 – Incertezza di misura per risultati numerici e nominali nelle Raccomandazioni SIPMeL Q16

| | Quantitativi numerici | Qualitativi nominali * |
|---|---|--|
| 1 Risultato (esempio) | mmol/L | Positivo/Negativo |
| 2 Incertezza della taratura (calibranti)* | Fabbricante o fattore di correzione | Sensibilità clinica |
| 3 Fonte dati per l'incertezza | Controllo di qualità interno * | Controllo di qualità interno** |
| 4 Materiale per l'incertezza | Vicino ai limiti decisionali | Vicino al limite di rilevabilità o C_{95} |
| 5 Espressione dell'incertezza ** | Scarto tipo (σ) o coefficiente di variazione (CV%) | Probabilità del risultato positivo (POD) |
| 6 Interpretazione ripetibilità in audit *** | Prova in doppio: differenza inferiore al limite di ripetibilità | Prova in doppio: due risultati positivi |
| * di norma a cura del fabbricante ** Non associare al risultato *** Campione come punto 4 | * A lungo termine | * anche per il debolmente positivo di risultati ordinali ** A lungo termine |

una stima rigorosa dell'incertezza su rilevazione del DNA e le analisi successive per il sequenziamento. Una stima robusta e completa dell'incertezza permette al laboratorio di capire meglio e prevedere quando i dati e le inferenze in genomica sono affidabili e quando non lo sono.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- [1] SIPMeL. Q16. Raccomandazioni per la stima dell'incertezza di misura nei laboratori medici (ISO 15189 e ISO 20914). **Disponibile qui**.
- [2] M. Pradella. 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.
- [3] M. Pradella. Requisiti dei laboratori medici, forensi, antidoping e alimentari: nuove ISO 15189 e ISO 17025. *Riv Ital Med Lab* 2019;15:252-62. DOI: 10.23736/S1825-859X.19.00033-1.
- [4] ISO/TS 20914:2019. Medical laboratories – Practical guidance for the estimation of measurement uncertainty. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2019.
- [5] 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.
- [6] CLSI EP12-A2 . User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document EP12-A2 Wayne, PA, USA; 2007.
- [7] NIST-QM-I, versione 10, 27-Dic-2016. **Disponibile qui**.
- [8] Accredia. DT-07-DL/DS rev.00 – Guida all'esecuzione di prove con risultati qualitativi. Roma 2013.
- [9] M. Pradella. ISO 17822, la qualità per esami con amplificazione di acidi nucleici *Riv Ital Med Lab* 2020;16:4-6. DOI: 10.23736/S1825-859X.19.00023-9.
- [10] ISO 20397-2:2021 Biotechnology – Massively parallel sequencing – Part 2: Quality evaluation of sequencing data. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2021.
- [11] CLSI MM09-A2:2014 Nucleic Acid Sequencing Methods in Diagnostic Laboratory Medicine, 2nd Edition. CLSI document MM09-A2 Wayne, PA, USA; 2014.
- [12] CLSI MM03-A3:2015 Molecular

- Diagnostic Methods for Infectious Diseases, 3rd Edition. CLSI document MM03-A3 Wayne, PA, USA; 2015.
- [13] CLSI MM22-A:2014 Microarrays for Diagnosis and Monitoring of Infectious Diseases, 1st Edition. CLSI document MM22-A Wayne, PA, USA; 2014.
- [14] CLSI MM17-A2:2018. Validation and Verification of Multiplex Nucleic Acid Assays, 2nd Edition. CLSI document MM17-A2 Wayne, PA, USA; 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.