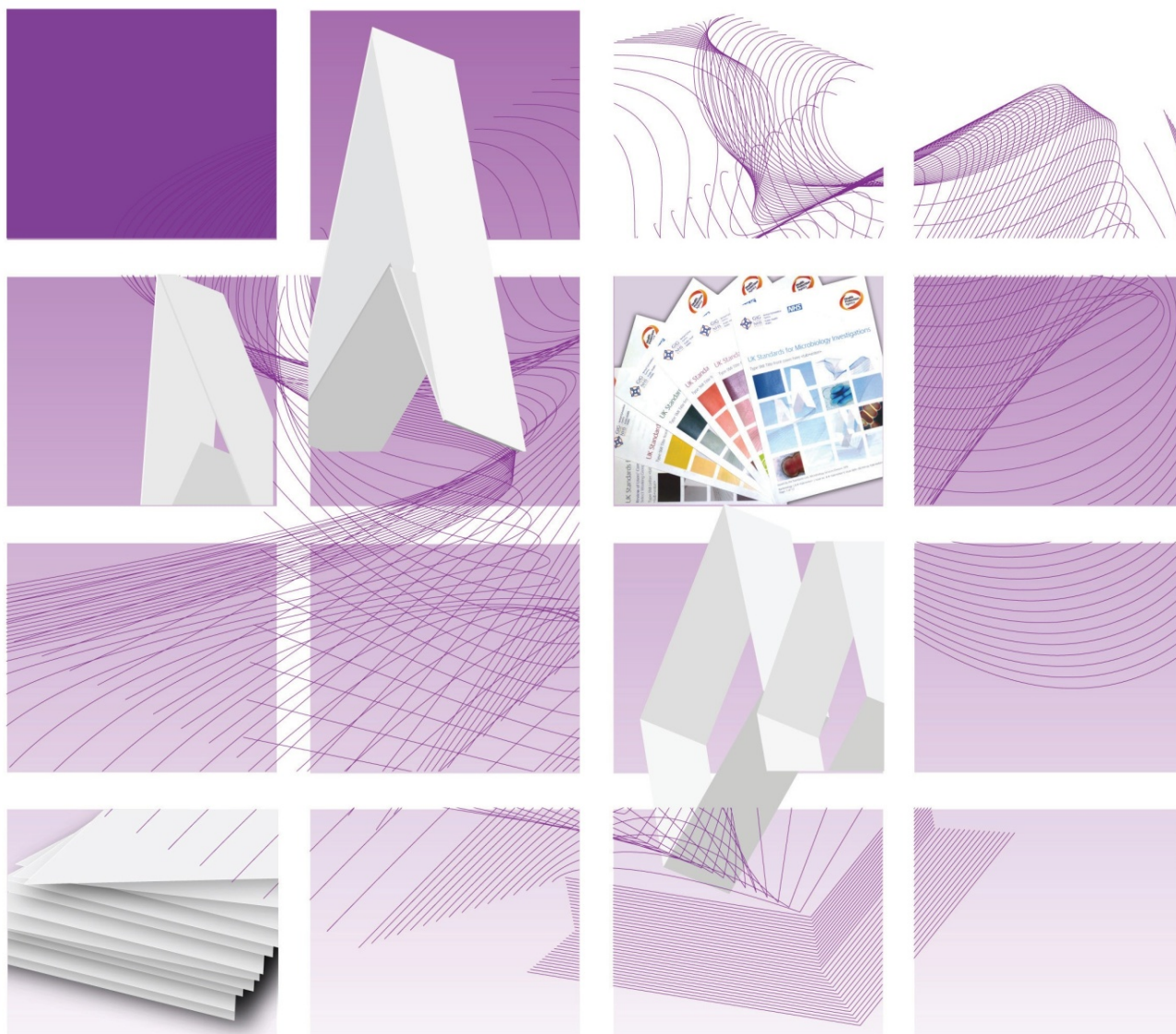


# Ricerche Microbiologiche: Procedure Standard del Regno Unito

Linea Guida per Sviluppo e Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da Amplificazione e Rilievo di Acidi Nucleici



## Ringraziamenti

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche (SMI - Standards for Microbiology Investigations) sono sviluppate sotto l'egida dell'Health Protection Agency (HPA) in collaborazione con il Servizio Sanitario Nazionale (NHS - National Health Service), la Sanità Pubblica del Galles e con le organizzazioni professionali i cui loghi sono di seguito elencati sul sito web <http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnerships>. Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare <http://www.hpa.org.uk/SMI/WorkingGroups>).

Si ringraziano per contributi forniti i numerosi operatori dei laboratori clinici, gli specialisti e i laboratori di riferimento che hanno fornito informazioni e commenti durante lo sviluppo di questo documento. Si ringraziano i Revisori Medici per le modifiche apportate ai contenuti clinici.

Per ulteriori informazioni contattare:

Standards Unit

Microbiology Services Division

Health Protection Agency

61 Colindale Avenue

London NW9 5EQ

E-mail: [standards@hpa.org.uk](mailto:standards@hpa.org.uk)

Website: <http://www.hpa.org.uk/SMI>

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche sono sviluppate con la collaborazione di:



## **Ricerche Microbiologiche: Procedure Standard del RU#:** **Situazione**

Sono stati identificati tre gruppi di utilizzatori per i quali le SMI sono particolarmente **importanti**<sup>[D1]</sup>:

- Nel Regno Unito sono principalmente destinate come risorsa generale ai professionisti che operano nel campo della medicina di laboratorio. La consulenza specialistica dovrebbe essere disponibile qualora necessaria.
- Le SMI forniscono ai clinici informazioni in merito allo standard dei servizi di laboratorio riferibili alle ricerche per la diagnosi delle infezioni nei loro pazienti e le documentazioni forniscono indicazioni che facilitano la prenotazione elettronica di test appropriati da parte dei reparti ospedalieri.
- Le SMI forniscono gli standard per le ricerche microbiologiche anche ai responsabili della sanità pubblica che devono considerarle come parte delle procedure da adottare per la salute (sia clinica che pubblica) per la propria popolazione.

### **Informazioni di base per le SMI**

Le SMI comprendono algoritmi e procedure raccomandate che riguardano tutte le componenti del processo diagnostico dalla fase pre-analitica (sindrome clinica) alle diverse fasi analitiche (prove di laboratorio) e post-analitiche (interpretazione e comunicazione dei risultati).

Gli algoritmi delle sindromi sono corredati da informazioni più dettagliate contenenti consigli sulle indagini per specifiche malattie e infezioni. Note orientative riguardano il contesto clinico, la diagnosi differenziale e indagini appropriate per particolari condizioni cliniche. Le note orientative descrivono metodologie di laboratorio essenziali che sono alla base della qualità, ad esempio la validazione della prova, la garanzia della qualità, la definizione dell'incertezza della determinazione.

La Standardizzazione del processo diagnostico conseguente all'adozione delle SMI consente di garantire in tutto il Regno Unito strategie d'indagine equivalenti nei diversi laboratori ed è una condizione essenziale per interventi nel campo della sanità pubblica, della sorveglianza, e per le attività di ricerca e di sviluppo. Nel Regno Unito le SMI rappresentano strategie omogenee per le prove diagnostiche e la programmazione degli interventi di sanità pubblica.

### **Coinvolgimento delle Organizzazioni Professionali**

Coinvolgimento delle Organizzazioni Professionali

Lo sviluppo delle SMI è condotto nell'ambito dell'HPA in collaborazione con il NHS, Public Health NHS Galles e con le organizzazioni professionali.

L'elenco delle organizzazioni partecipanti può essere trovato su sito <http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnerships>. L'inclusione del logo di un'organizzazione in una SMI implica il sostegno degli obiettivi e del processo di preparazione del documento. I rappresentanti delle organizzazioni professionali fanno parte del comitato direttivo e dei gruppi di lavoro che sviluppano le SMI, anche se le opinioni dei partecipanti non sono necessariamente quelle espresse da tutta l'organizzazione che essi rappresentano.

---

<sup>#</sup>Gli Standard di Microbiologia del RU erano in precedenza conosciuti come Metodi Nazionali Standard.

Microbiologia è usato come termine generico per includere le due specialità di Microbiologia Medica riconosciute dal GMC (General Medical Council), (che comprende Batteriologia, Micologia e Parassitologia) e la Virologia Medica.

## Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

Le SMI sono sviluppate, revisionate e aggiornate con un ampio processo di consultazione. I documenti elaborati riflettono l'opinione della maggior parte dei partecipanti. Le SMI sono liberamente disponibili per la consultazione su <http://www.hpa.org.uk/SMI> come documenti controllati in formato Adobe PDF.

### Assicurazione di Qualità

La procedura per lo sviluppo delle SMI è certificata dalla ISO 9001:2008.

Evidence NHS ha accreditato il processo utilizzato dal HPA di produrre le SMI. L'accREDITamento è valido per tre anni dal luglio 2011. L'accREDITamento è applicabile a tutte le indicazioni prodotte dal mese di ottobre 2009 utilizzando i processi descritti in Standard Operating Procedures della HPA di SW3026 (2009) versione 6.

Le SMI rappresentano una procedura standard di buona qualità pratica alla quale si devono attenere per la propria attività tutti i laboratori di microbiologia clinica e di sanità pubblica del Regno Unito. Le SMI sono ben referenziate e non rappresentano gli standard minimi di attività, e neppure il più alto livello di complesse indagini di laboratorio disponibili nel Regno Unito. Utilizzando le SMI, i laboratori dovranno tenere conto delle esigenze locali e intraprendere ricerche aggiuntive qualora opportune. Le SMI aiutano i laboratori a soddisfare i requisiti dell'accREDITamento con la promozione di procedure d'elevata qualità che possono essere verificate. Le SMI forniscono inoltre un punto di riferimento per lo sviluppo del metodo. Queste stesse devono essere utilizzate in associazioni con altre SMI.

I laboratori di microbiologia del Regno Unito che non utilizzano le SMI dovrebbero essere in grado di dimostrare almeno l'equivalenza delle loro metodologie di prova.

Le prestazioni della SMI dipendono dal personale ben addestrato e dalla qualità dei reagenti e delle attrezzature utilizzate. I laboratori dovrebbero assicurare che tutti i reagenti di tipo commerciale e quelli messi a punto in laboratorio siano stati validati e risultati idonei allo scopo. I laboratori devono partecipare a programmi di valutazione di qualità esterni ed eseguire le relative procedure del controllo di qualità interno.

Sebbene sia stata posta la massima attenzione nella preparazione delle SMI, la HPA, e l'organizzazione(i) subentranti e qualsiasi altra organizzazione di sostegno, dovranno, per quanto possibile nel rispetto della legge vigente, escludere la responsabilità per qualsiasi spreco, costo, reclamo, danno o maggior spesa derivante da o connesse all'uso di una SMI o qualsiasi informazione ivi contenuta. Se sono apportate modifiche a una SMI, deve essere chiaro dove e chi le ha apportate.

Le SMI sono assoggettate ai diritti d'autore della HPA, che devono essere riconosciuti quando appropriato.

La Tassonomia microbica è aggiornata al momento in cui è stata completata la revisione.

### Regolamentazione della Gestione dei dati Sensibili

Le valutazioni delle Regole Anti-discriminazione concernenti le SMI sono disponibili all'indirizzo.

<http://www.hpa.org.uk/SMI>.

La HPA è un'organizzazione che condivide le direttive Caldicott. Ciò significa prendere ogni possibile precauzione per prevenire la diffusione non autorizzata d'informazioni sui pazienti e di garantire che le informazioni riguardanti gli stessi siano mantenute in condizioni di sicurezza.

### Citazione Suggesta per questo Documento

Health Protection Agency. (2013). Guidance on the Development and Validation of Diagnostic Tests that Depend on Nucleic Acid Amplification and Detection. UK Standards for Microbiology Investigations. P 4 Emissione 1. <http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>.

Protocolli UK | P 4 | Emissione no: 1 | Data emissione 01.02.13 | Pagina: 4 di 49

## Contenuti

---

|   |    |
|---|----|
| RINGRAZIAMENTI.....   | 2  |
| RICERCHE MICROBIOLOGICHE: PROCEDURE STANDARD DEL RU:<br>SITUAZIONE.....                 | 3  |
| TABELLA DELLE MODIFICHE .....   | 7  |
| SCOPO DEL DOCUMENTO .....   | 8  |
| INTRODUZIONE.....   | 8  |
| 1 PERSONALE PER IL PROGETTO .....   | 9  |
| 22 STRUMENTAZIONE .....   | 9  |
| 3 PIANIFICAZION E INIZIO: CREAZIONE DI UNA SQUADRA PER IL<br>RIESAME DEL PROGETTO ..... | 9  |
| 4 PIANO PER LO SVILUPPO DEL SAGGIO .....  | 11 |
| 5 COMPITI FONDAMENTALI PER LO SVILUPPO DEL SAGGIO .....                                 | 12 |
| 6 VALIDAZIONE TECNICA.....  | 16 |
| 7 ITER DI VALIDAZIONE.....  | 17 |
| 8 VALUTAZIONE DEL RISCHIO .....   | 23 |
| 9 ANALISI DEI RISULTATI E FORMULAZIONE AZIONE DELLA RELAZIONE,,,,<br>TECNICA .....      | 23 |
| 10 REVISIONE DELLA RELAZIONE TECNICA E FIRMA .....                                      | 24 |
| 11 ISTRUZIONI PER L'USO.....  | 24 |
| 12 REQUISITI PER ETICHETTATURA.....   | 24 |
| 13 PRODUZIONE E CONSERVAZIONE DEI DOCUMENTI.....  | 24 |
| 14 VALIDAZIONI DEI SAGGI PRONTI ALL'USO .....   | 24 |
| 15 'IMMISSIONE SUL MERCATO' DEL SAGGIO .....  | 25 |
| 16 PRODUZIONE DI REAGENTI PER USO DI ROUTINE .....                                      | 25 |
| 17 SORVEGLIANZA E VERIFICA POST-IMPLEMENTAZIONE.....                                    | 26 |
| 18 DOCUMENTAZIONE.....  | 26 |
| APPENDIX 1 – PROGETTAZIONE E IMPLEMENTAZIONE DEI CONTROLLI INTERNI ...                  | 27 |
| APPENDIX 2 – PROGETTAZIONE DI PARAMETRI PER ESPERIMENTI DI VALIDAZIONE                  | 32 |
| APPENDIX 3 – METODI PER DETERMINAZIONE DEL PERIODO DI VALIDITA' .....                   | 34 |
| APPENDIX 4 – MODULO PER PROCEDURA DI SVILUPPO SAGGIO .....                              | 36 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>APPENDIX 5 – RELAZIONE RIASSUNTIVA PER VALIDAZIONE DI CONFEZIONE O<br/>REAGENTE .....</b>                                      | <b>38</b> |
| <b>APPENDIX 6 - GUIDA PER LIVELLO DI RIVALIDAZIONE CONSIDERATA<br/>ACCETTABILE PER UNA SERIE DI MODIFICHE AL PROTOCOLLO .....</b> | <b>40</b> |
| <b>APPENDIX 7 – MODULO DEL PIANO DEL PROGETTO E FIRMA .....</b>   | <b>42</b> |
| <b>APPENDIX 8 - WESTGARD .....</b>  | <b>43</b> |
| <b>APPENDIX 9 – SOLUZIONE DI PROBLEMI DIAGNOSTICI DELLA PCR REAL-TIME .....</b>   | <b>46</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>   | <b>49</b> |

## Tabella delle modifiche

---

Ciascun metodo SMI possiede una registrazione separata delle correzioni. Quelle attuali sono specificate in questa pagina. Le precedenti modifiche sono disponibili presso la [standards@hpa.org.uk](mailto:standards@hpa.org.uk).

I documenti nuovi o revisionati devono essere controllati in ciascun laboratorio in accordo con il sistema locale di gestione della qualità.

|  |                  |
|--|------------------|
| Modifica No/Data.                        | -//01.02.13      |
| Emissione eliminata no.                  | -                |
| Emissione inserita no.                   | 1                |
| <b>Sezione(i) interessate/Pagina no.</b> | <b>Modifica.</b> |
|  |                  |
|  |                  |

## Scopo del documento

---

Questa SMI descrive una proposta generica per sviluppo *in-house* di un saggio e la validazione di nuovi saggi di amplificazione dell'acido nucleico, compresa la Polymerase Chain Reaction real-time (PCR). Questa proposta può essere usata selettivamente ma devono essere completamente osservate le principali indicazioni standard.

Questa SMI deve essere usata in combinazione con le altre SMI.

## Introduzione

---

Numerosi sono i rischi associati all'introduzione di metodi diagnostici nuovi o modificati, sia di quelli ottenuti attraverso lo sviluppo interno (*in house*), o adottando quelli sviluppati altrove (anche disponibili in commercio o no); pertanto è richiesta l'adozione di un'accurata procedura di validazione e di verifica.

Al fine di soddisfare gli standard descritti nella sezione F1.2 dei Clinical Pathology Accreditation (CPA) e quelli della sezione 8 del codice Standard di condotta per la ricerca, si deve adottare un metodo che garantisca che i saggi di prova sono "adatti a uno scopo." Il presente documento fornisce una linea guida per lo sviluppo e descrive come si realizza la procedura di validazione. Un metodo di prova può essere una confezione commerciale, un saggio di sviluppo interno, o un insieme di reagenti acquistati separatamente e utilizzati per preparare un saggio *in-house*.

Il termine 'validazione' è spesso usato in modo molto impreciso e può comprendere una varietà di procedure diverse. Per l'industria manifatturiera: "La validazione è un processo di garanzia della qualità con elaborazione di prove che assicurano un grado molto elevato di garanzia che un prodotto, servizio, o sistema soddisfi i requisiti previsti. Questo spesso implica l'accettazione d'idoneità a uno scopo per gli utenti finali e alle altre parti interessate al prodotto". La validazione è una procedura che si avvale dell'evidenza e richiede un proprio processo di progettazione per garantire che i nuovi saggi soddisfino i sistemi standard di laboratorio e siano conformi alla gestione clinica e ai requisiti di gestione del rischio. In questa procedura sono previste un certo numero di fasi includenti la progettazione e l'inizio, lo sviluppo e l'ottimizzazione del saggio, la sua validazione, l'immissione sul mercato e la verifica (es. un processo di controllo della qualità per valutare se il saggio soddisfa le proprie specifiche), e infine la sua implementazione. Il metodo di validazione può essere utilizzato per valutare la qualità, l'affidabilità e la coerenza dei risultati analitici. Essa è pertanto una parte integrale di qualsiasi buona pratica analitica. Fornisce un utile riferimento l'allegato 15 della Guida Pratica per la Buona Fabbricazione dell'Unione Europea<sup>1</sup> (Annex 15 to the European Union (EU) Guide to Good Manufacturing Practice<sup>1</sup>) che si occupa della qualificazione e validazione.

I metodi analitici richiedono la validazione o la ri-validazione prima di essere inseriti nella routine; ogni volta che si modificano le condizioni originali della procedura (ad esempio, l'uso di uno strumento con caratteristiche diverse o campioni inseriti in una matrice diversa); e ogni volta che il metodo è cambiato o modificato rispetto alla specifica originale. Le modifiche di un protocollo che possono essere considerate significative e che richiedono la ri-validazione con prove adeguate per prestazioni equivalenti prima della implementazione dipendono dalle caratteristiche specifiche della prova. Si possono verificare situazioni diverse in cui è opportuno ripetere solo un sottoinsieme delle attività di validazione. Ad esempio, se si cambia il metodo di estrazione può non essere necessario controllare la specificità, ma la sensibilità che richiederà una nuova valutazione.

Per tutte le procedure esistenti e per quelle nuove deve essere prodotta la documentazione della validazione. Questa può fare riferimento ai risultati già registrati in cartelle di lavoro, documenti, relazioni. Le modifiche dei saggi esistenti (compresi quelli disponibili in commercio) richiederanno un aggiornamento del documento di validazione esistente o la disponibilità di uno nuovo.

È essenziale fornire la prova documentale che il saggio è adatto per lo scopo previsto. Questo può coinvolgere gli esperimenti per la determinazione dell'accuratezza, specificità, sensibilità,



affidabilità e riproducibilità. La validazione può essere estesa, per esempio, nel caso di un nuovo sviluppo di un saggio in-house, o limitata nell'ambito di un'applicazione, per esempio, nel caso di un saggio commerciale già in uso che ha avuto lievi modifiche.

Per i saggi basati sull'amplificazione dell'acido nucleico, il presente documento integra la guida sulle modalità della validazione disponibile nell'UK Standards for Microbiology Investigation [Q 1 - Commercial and In-House Diagnostic Tests: Evaluations and Validations](#).

## 1 Personale per il Progetto

---

Tutto il personale facente parte del progetto deve avere un'adeguata formazione, competenza ed esperienza. Deve essere disponibile la registrazione della qualifica di ciascuno di loro.

Deve essere nominato Il Responsabile di gestione del Progetto, in modo più appropriato, un soggetto del Gruppo di Direzione, a livello di Capo Settore o Direttore di Laboratorio, che assuma la responsabilità per il completamento del progetto e la responsabilità di firmare la procedura completa di validazione e la SOP (Standard Operating Procedure).

Al Responsabile del Progetto è assegnata la responsabilità che include l'attività operativa del laboratorio richiesta per lo sviluppo del saggio, la sua validazione, l'analisi dei risultati, la compilazione del documento di validazione, la relazione scritta, la presentazione dei risultati agli incontri di revisione, la scrittura e l'aggiornamento della SOP e la formazione del gruppo per emettere nuove SOP.

Devono essere chiaramente definite le linee di responsabilità di tutto il personale partecipante al progetto.

Il Capo Progetto può essere anche il Responsabile di Gestione del Progetto.

## 2 Strumentazione

---

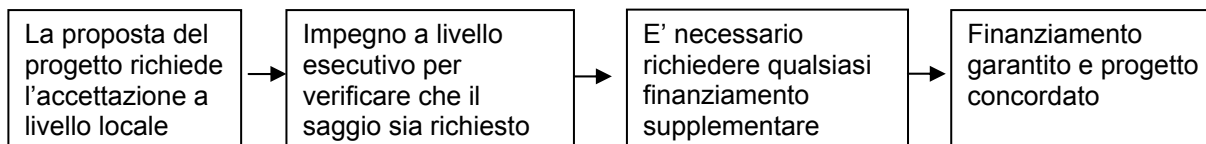
Tutte le apparecchiature utilizzate per lo sviluppo dei saggi e le incombenze per la validazione devono essere mantenute, assistite, calibrate e controllate in modo adeguato per garantirne un uso appropriato. Ciò è essenziale per garantire che tutte le condizioni possano essere riprodotte con precisione durante la produzione di routine dei reagenti e le prestazioni del saggio.

## 3 Pianificazione e Inizio: Creazione di una Squadra per il Riesame del Progetto

---

Le indicazioni per lo sviluppo dei prodotti diagnostici presentano difficoltà inerenti idoneità, capacità, o opportunità di migliorare il servizio, in funzione delle nuove conoscenze e della tecnologia disponibile.

Figura 1: Fasi iniziali di sviluppo del saggio



Le prime fasi del processo dello sviluppo (Figura 1) devono garantire un accordo con i massimi livelli gestionali e per il lavoro da svolgere e l'approvazione di qualsiasi finanziamento necessario.

Lo scopo della fase della progettazione è l'elaborazione di un piano di progetto chiaro e concordato. Per esaminare tutti gli aspetti del piano dovrebbe essere predisposto un insieme di persone idoneo ('gruppo di verifica'). Questo dovrà evidenziare anche lo stato di avanzamento del lavoro, il piano di validazione, la validazione che i risultati del test concordano con gli obiettivi proposti e piani post-distribuzione per monitorare le prestazioni.

## Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

Un esempio di un gruppo adeguato comprende uno Specialista Clinico, due rappresentanti clinici (Virologi Medici o Microbiologi), uno Specialista Biomedico e il responsabile locale della Qualità. È auspicabile che almeno uno dei membri clinici/medici del gruppo sia un utente finale del saggio per la conseguente possibilità di fornire utili suggerimenti per i parametri di progettazione e validazione e per garantire l'utilità clinica. Si raccomanda l'inserimento nel gruppo di verifica di uno statistico nel caso in cui nessuno degli altri membri possieda un'adeguata formazione in questo settore. In alternativa, dovrebbe essere consultato un esperto di statistica per una valutazione sul progetto di validazione dello studio. Il responsabile del progetto o il capo progetto, ma non entrambi, tranne che i due ruoli siano delegati a una sola persona, possono essere membri del gruppo di verifica.

Il gruppo di revisione ha le seguenti responsabilità:

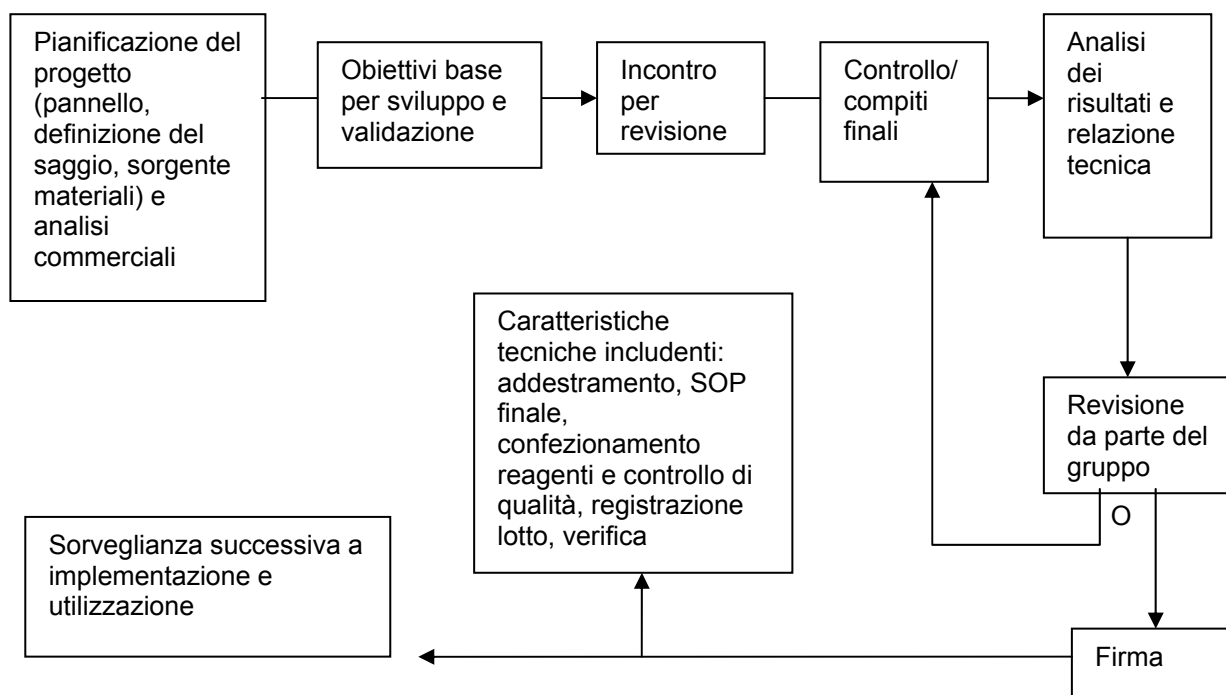
- Garantire che le finalità e gli obiettivi dello sviluppo del nuovo saggio siano ben definiti. In particolare, come si ritiene si possano migliorare o colmare gli inconvenienti delle disponibilità attuali. Ciò include l'identificazione delle richieste diagnostiche, degli utenti, le parti interessate, e le alternative ora disponibili.
- Garantire che il registro del rischio sia stato approntato. Il registro deve includere i rischi associati al successo/fallimento del progetto e l'implementazione del saggio (ad esempio, gli utilizzatori possono usare tipi inappropriati di campioni o interpretare erroneamente i risultati). Si devono fornire specifiche indicazioni per ridurre le conseguenze di particolari rischi.
- Garantire che siano stati valutati i problemi inerenti la sicurezza di laboratorio nelle diverse fasi di sviluppo del saggio e nel corso della procedura di validazione.
- Analisi della motivazione aziendale inerente qualsiasi problema, costo di esecuzione del nuovo saggio, prezzo da pagare per il test tenendo conto di altri saggi alternativi che possono essere disponibili. Si deve inoltre considerare qualsiasi potenziale rischio finanziario, per esempio, esistenza di brevetti che possono essere associati allo sviluppo proposto.
- Esecuzione di un'analisi commerciale che comprenda la tutela della proprietà intellettuale e della proprietà, e la potenziale commercializzazione. Se il saggio o i reagenti devono essere forniti ad altre organizzazioni dovrebbero essere inclusi nell'analisi il costo per soddisfare i requisiti normativi (es. IVD/marcatura CE).
- Verificare che siano stati considerati i costi per l'assunzione di persone in grado di fornire consulenza o la condivisione dei costi.
- Verificare che siano stati previsti gli aspetti inerenti le risorse umane, tra cui la formazione.
- Garantire che sono stati stabiliti i mezzi per una gestione efficiente del progetto, tra cui la nomina di consulenti e revisori, se necessario.
- Approvazione e firma (per esempio di modulo idoneo, consultare Appendice 7) del piano di progetto dettagliato.
- Approvazione e firma (per esempio di applicazione idonea consultare Appendice 7) della validazione del piano.
- Revisione dei risultati dello studio di validazione e delle raccomandazioni sul giudizio se il saggio è idoneo alla distribuzione.
- Revisione della pianificazione e pianificazione della distribuzione successiva.
- Verifica che la documentazione del progetto sia disponibile su ADRG e che il documento è conservato in questa sede.

## 4 Piano per lo Sviluppo del Saggio

Gli obiettivi per lo sviluppo di un saggio devono garantire una determinazione accurata e affidabile solo dell'analita d'interesse presente nei campioni reali (es. paziente), per garantire l'uniformità dei saggi e reagenti nel tempo, e di conservare la completa tracciabilità dei risultati. Gli obiettivi del progetto devono essere ben definiti come ad esempio lo sviluppo di un robusto, conveniente saggio IVD (In Vitro Diagnostic assay) per il gene *mecA* di *Staphylococcus aureus* in prelievi da emocolture, urine, tessuto e brodi di coltura, in grado di essere eseguito da personale di laboratorio clinico, con formazione di base in biologia molecolare e in grado di fornire risultati nel medio-tardo pomeriggio del giorno di esecuzione dell'estrazione del campione.

Il piano del progetto è sviluppato e implementato come illustrato in Figura 2. Il gruppo di revisione e il responsabile del progetto dovrebbero proporre una serie di incontri di programmazione, eseguire ricerche bibliografiche, valutare opzioni e, se possibile, consultarsi con altri centri che eseguono saggi uguali o simili. Il responsabile del progetto e il gruppo a esso dedicato devono accordarsi sulla Definizione del Test, che dovrebbe includere un nome per il saggio e la descrizione del controllo.

**Figura 2: Sviluppo del saggio e piano di validazione**



Il diagramma di flusso illustra la procedura. Quando il piano è stato definito, il responsabile diventerà il referente dell'attività di laboratorio. Si dovrà programmare una riunione del gruppo di revisione alla quale il capo progetto dovrà presentare i risultati. Qualsiasi attività di controllo o analisi, se richiesta, sarà concordata e, in seguito, il responsabile del progetto genererà la relazione tecnica. La relazione tecnica sarà in seguito inviata al gruppo del riesame, che approverà il saggio considerandolo idoneo alla distribuzione commerciale per l'uso di routine (annotazioni tecniche), o richiederà ulteriori accertamenti da eseguire prima di confermarne l'idoneità. Il personale addetto alla routine potrà poi iniziare l'addestramento.

Il piano di sviluppo deve comprendere una descrizione dei dettagli tecnologici del saggio, comprese le informazioni sulle piattaforme e i componenti chimici da utilizzare. Devono essere descritti i reagenti da impiegare e la procedura del saggio. Se possibile, si dovrebbero ridurre al minimo il numero di aggiunte di reagenti separati combinandone diversi fra loro. Per la PCR sarebbe ottimale l'uso di due miscele di reagenti da conservare pronte all'uso. Quando possibile, le preparazioni dei reagenti per eseguire il saggio in una seduta

## Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

diagnostica, dovrebbero essere economicamente convenienti e tali da poter eseguire il test con i lotti di campioni aventi le dimensioni normalmente richieste.

Ove possibile il protocollo del saggio dovrebbe essere progettato per ridurre al minimo il tempo di esecuzione e la sua complessità tecnica. In generale, il tempo totale della prova dovrebbe essere inferiore a un giorno lavorativo in modo che i risultati possano essere consegnati il giorno stesso del ricevimento del campione. Il piano di sviluppo dovrebbe mirare a ridurre al minimo il numero di passaggi di intervento dell'operatore e il numero di volumi diversi per le aggiunte o le ricostituzioni coinvolte nel test. In modo ottimale, i volumi devono essere misurati in cifra intera (cioè 5µL piuttosto che 4.5µL) ed essere il più grande possibile per facilitare l'operatore o la precisione dello strumento.

Il piano di sviluppo deve specificare in dettaglio i requisiti per il successo del test, considerando la specificità analitica desiderata, la sensibilità analitica, la sensibilità diagnostica, la specificità diagnostica, la sensibilità clinica, la specificità clinica e la riproducibilità. È importante considerare il numero di campioni necessari per la validazione del test. La Tabella I riporta l'intervallo di confidenza al 95% per diversi gradi di sensibilità del saggio, e il numero di campioni da sottoporre a prova consigliati da Nature Reviews Microbiology<sup>2</sup>.

**Tabella I: Relazione tra dimensione del campione e intervallo di confidenza al 95%**

| Numero richiesto di soggetti infetti (non-infetti)* | Sensibilità stimata del saggio (o specificità)# |       |       |       |      |      |
|---|---|-------|-------|-------|------|------|
|   | 50%   | 60%   | 70%   | 80%   | 90%  | 95%  |
| 50  | 13.9%   | 13.6% | 12.7% | 11.1% | 8.3% | -    |
| 100   | 9.8%  | 9.6%  | 9.0%  | 7.8%  | 5.9% | 4.3% |
| 150   | 8.0%  | 7.8%  | 7.3%  | 6.4%  | 4.8% | 3.5% |
| 200   | 6.9%  | 6.8%  | 6.4%  | 5.5%  | 4.2% | 3.0% |
| 500   | 4.4%  | 4.3%  | 4.0%  | 3.5%  | 2.6% | 1.9% |
| 1,000   | 3.1%  | 3.0%  | 2.8%  | 2.5%  | 1.9% | 1.4% |

\* Come definito dal test standard di riferimento.

# Intervallo di confidenza al 95% attorno alla sensibilità stimata (+ / - valore in tabella)

Deve essere specificata la tipologia del campione e i volumi indispensabili e desiderabili. I metodi di preparazione del campione devono essere specificati, costituendo una parte importante per la validazione della prova diagnostica.

Dovrebbe essere richiesta l'approvazione etica per l'uso di materiale clinico umano. E' disponibile una linea guida su ricerca ed etica presso il sito web del Department of Health: Guidance on research ethics and the Integratec Research Application Research (IRAS).

Devono essere specificati i controlli da utilizzare.

Deve essere specificata la previsione del periodo di validità dei reagenti o delle confezioni. Devono essere specificate le procedure in materia di etichettatura dei reagenti miscelati in sede. L'etichettatura deve includere il numero di lotto e lo spazio per l'inserimento della data 'in uso'

## 5 Compiti fondamentali per lo sviluppo del saggio

### Scelta delle sequenze oligonucleotidiche e prove con materiale di controllo

Se sono richiesti nuovi primer e sonda(e), si deve eseguire un censimento completo della letteratura e delle banche dati per identificare le sequenze idonee. La progettazione dei primer e delle sonde deve essere effettuata utilizzando opportuni parametri (ad esempio quelle richieste per primer e sonde Taqman) e, a tal fine se appropriato, si dovrebbe sfruttare l'uso di programmi computerizzati, quale ad esempio la versione più recente del software Primer Express di Applied Biosystems. In fase di progettazione di sequenze oligonucleotidiche devono essere garantiti diversi parametri, in particolare la sequenza bersaglio di specificità unica (dovrebbe essere consultato il National Center for Biotechnology Information (NCBI) database engine "BLAST" per

## Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

controllare le sequenze da utilizzare). Per garantire la migliore rilevazione di tutti o quanti più tipi possibili dei propri componenti. Per generi con numerosi sottotipi, l'amplificazione iniziale dovrebbe considerare come alternativa l'uso di primer degenerati, una miscela di primer consensus per sottogruppi.

In molti casi sarà utile, nel processo di progettazione dei primer e della sonda, creare un allineamento aggiornato (ad esempio mediante l'uso di ClustalW o BioEdit) di una collezione completa di sequenze bersaglio (cioè geni, open reading frames (ORF), ecc ) di ceppi diversi, sottotipi o altri importanti taxa. Le sequenze dovrebbero essere disponibili per mezzo un appropriato set di strumenti software disponibili sul sito web del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Gli allineamenti devono essere utilizzati per controllare la natura conservativa degli oligonucleotidi prototipo, vale a dire, se sono presenti polimorfismi nucleotidici tra ceppi significativi (cioè ceppi che potrebbero essere circolanti nella popolazione per la quale il saggio sarà utilizzato), tali siti devono essere evitati e, se disponibili, si sceglieranno nuove sequenze nucleotidiche. Se la scelta non è disponibile, possono essere accettati alcuni polimorfismi, purché non influenzino significativamente l'ibridazione dell'oligonucleotide in questione (ad esempio in cui sono possibili appaiamenti di basi guanina adenina) o se possono essere superati con l'utilizzo di basi non convenzionali (es. l'inosina che consente un'ibridazione aspecifica).

Se i primer e le sequenze della sonda sono già noti, ad esempio, in un documento pubblicato, o ottenuti da un altro centro di diagnostica molecolare, dovrebbero comunque essere ancora controllati con banche dati e allineamenti come "mutazioni tipografiche" (vale a dire errori) verificatesi in zone critiche della sequenza e con studi recenti che potrebbero aver rivelato l'esistenza sequenze varianti.

Devono essere scelte sequenze oligonucleotidiche e piattaforme compatibili con fluorofori e quencher. Devono essere selezionate le concentrazioni ottimali di oligonucleotidi e dei componenti della master mix (cioè la miscela contenente Taq DNA polimerasi, altri enzimi se necessario, dNTPs, tampone ecc). Ciò è ottenuto saggiando concentrazioni differenti di primer e sonde con una serie di diluizioni di acido nucleico bersaglio puro (che si estendono sotto il limite nominale di rilevazione). Dovrebbero essere scelte le concentrazioni di oligonucleotidi che consentono limiti di rilevazione ottimali su base riproducibile. In generale, è utile utilizzare basse concentrazioni di oligonucleotidi per contenere al minimo la possibilità di reazioni crociate e ridurre i costi. Si devono ottenere prove sufficienti che i primer siano in grado di amplificare la specifica sequenza bersaglio.

La valutazione dell'efficienza della PCR deve essere saggiata eseguendo la PCR real time con una serie di diluizioni decimali del materiale di controllo. Può essere opportuno eseguire questa prova durante la valutazione della sensibilità analitica. L'efficienza della PCR è utile per valutare la progettazione dei primer e delle sonde ed è essenziale per identificare i livelli minimi di efficienza nello sviluppo del saggio PCR quantitativo.

Per calcolare l'efficienza della PCR i valori di C<sub>q</sub> (ciclo di quantificazione, generalmente il ciclo in cui è determinato il segnale che diviene importante perché, per esempio, è stata superata la soglia di fluorescenza) di ciascuna diluizione, posti poi su un diagramma in relazione alla quantità nota o al fattore di diluizione. Questo può essere ottenuto utilizzando il software in tempo reale dello strumento. Si ottiene la pendenza della curva per una serie di diluizioni decimali che, per un saggio di PCR efficiente, dovrebbe essere -3,3 100%. L'efficienza è calcolata dall'equazione  $E = 10^{-1/pendenza} - 1$ . Sono generalmente accettabili gradienti della curva di titolazione di -3,1 e -3,6 che esprimono efficienza di reazione compresa tra il 90 e il 110%.

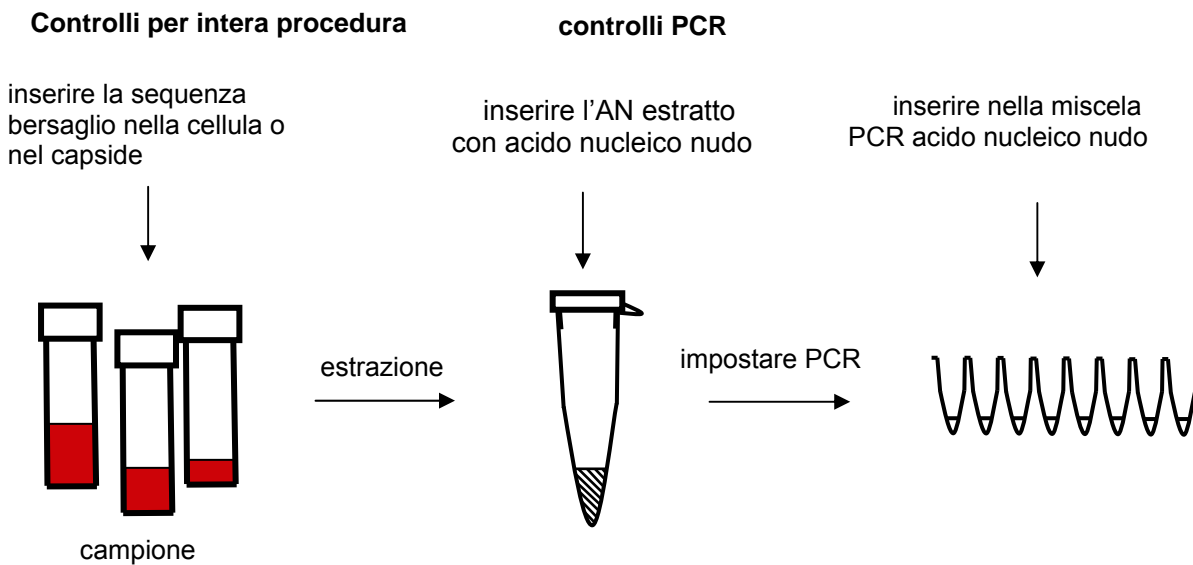
Determinata la pendenza della curva i seguenti siti web sono in grado di calcolare l'efficienza della reazione.

- [http://www.finnzymes.com/java\\_applets/qpcr\\_efficiency.html](http://www.finnzymes.com/java_applets/qpcr_efficiency.html)
- <http://efficiency.gene-quantification.info/>

### Selezione controlli interni della PCR

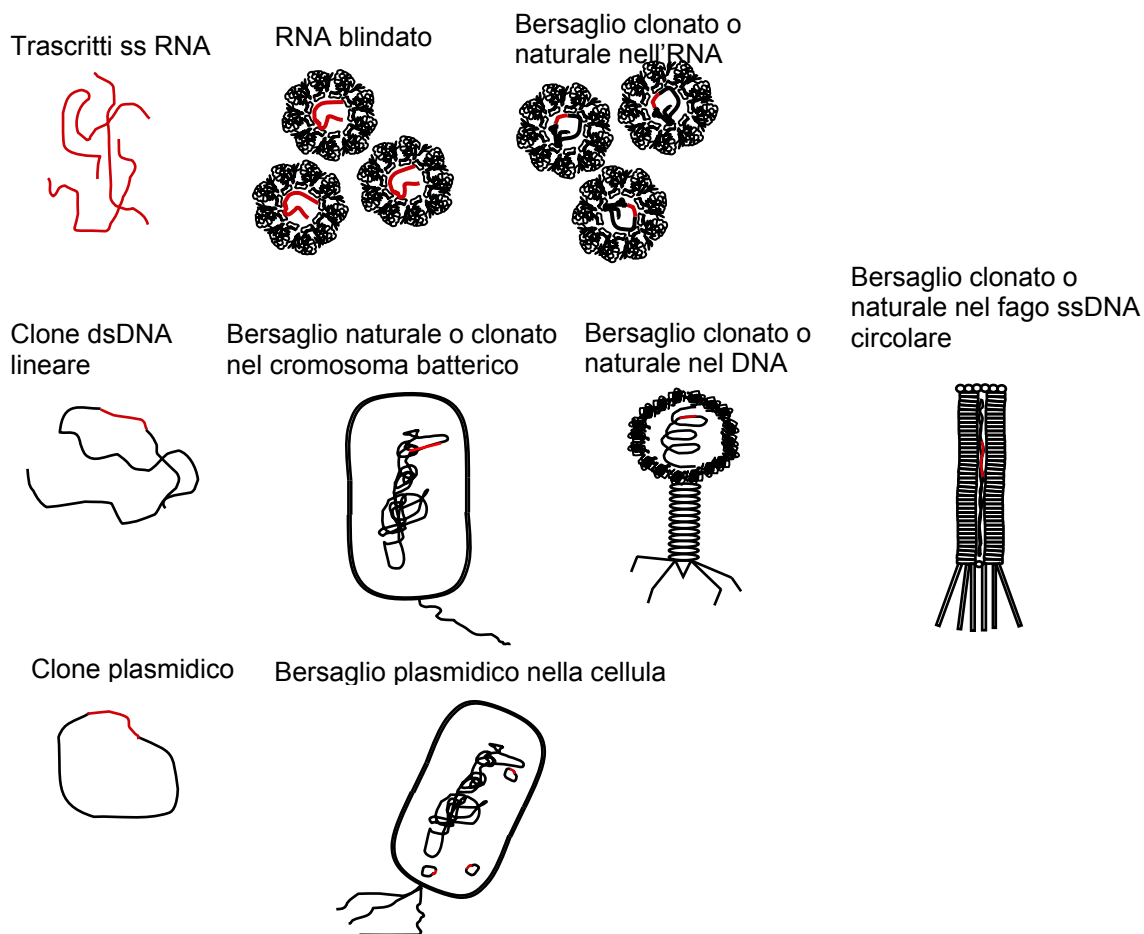
Nella diagnostica PCR possono verificarsi falsi negativi dovuti a problemi riscontrati nelle varie fasi del ciclo operativo. Anche se alcuni sono di tipo generico, riscontrabili anche in altri metodi di prova, alcuni sono specifici, correlati alla progettazione e all'uso diagnostico della PCR. I problemi nella diagnostica PCR, per lo più inevitabili, quali i risultati falsi negativi, sono dovuti a incidenti di estrazione o a reazioni di inibizione. L'incidenza dei risultati falsi negativi può essere diminuita con buone pratiche di laboratorio e seguendo le specifiche linee guida. L'uso di controlli appropriati consente di individuare i risultati falsi negativi e riduce notevolmente il rischio di diagnosi e refertazione errate. Pertanto, è consigliabile includere un completo controllo di processo (cioè in grado di rilevare il guasto di estrazione e l'inibizione della PCR). La figura 3 illustra la differenza tra l'intera procedura e i controlli PCR.

**Figura 3: Controlli per PCR real-time**



È indispensabile utilizzare un appropriato RNA o DNA di controllo interno in funzione del bersaglio amplificato. Devono essere scelti controlli di processo completi per ottenere una protezione adeguata al metodo di estrazione adottato, vale a dire, in modo ottimale, l'acido nucleico bersaglio deve essere rinchiuso in un involucro virale o all'interno della parete cellulare batterica. La Figura 4 mostra una selezione di materiali di controllo. Il controllo interno deve essere progettato in modo che qualsiasi effetto negativo sulla sensibilità del saggio sia ridotto al minimo. Si deve inoltre dimostrare che il controllo interno e il bersaglio della PCR siano ugualmente influenzati dalla presenza di eventuali sostanze inibenti. Ciò può essere ottenuto inserendo nella reazione PCR potenziali inibitori, quale emoglobina o reagenti come etanolo o fenolo, che possono essere rilevati dopo il processo di estrazione. Può essere utilizzato lo spostamento dei valori soglia per valutare l'impatto dovuto all'inibizione sull'amplificazione del controllo interno e dell'organismo bersaglio.

**Figura 4: Controlli bersaglio di acido nucleico per real-time PCR**



La sequenza bersaglio è rappresentata in rosso e l'acido nucleico vettore in nero.

Altre informazioni sul disegno e sull'applicazione dei controlli interni sono riportate nell'Appendice 1 di questo documento.

I controlli esterni (es. quando con reazione PCR si saggiano materiali di riferimento e in parallelo il campione) sono meno soddisfacenti, anche se semplici da progettare e realizzare. Il rischio di risultato falso negativo rimane inosservato, anche se notevolmente ridotto. Tuttavia, per la PCR quantitativa è vantaggioso che la reazione di controllo non interferisca con l'accuratezza del test.

### **Valutazione del protocollo di estrazione di DNA/RNA**

La scelta del protocollo di estrazione dipenderà dal tipo di materiale del campione, numero di campioni da estrarre, frequenza del test (ad esempio, una serie analitica ogni giorno o una volta la settimana) e costo. Per un saggio di diagnostica molecolare, diversamente dalla progettazione dei primer e della sonda, l'estrazione è considerata la parte più critica. Se si utilizza una piattaforma automatizzata con una confezione per l'estrazione degli acidi nucleici fornita su misura, si può prevedere una pre-fase di trattamento manuale, specialmente per campioni difficili da trattare, come feci, espettorato o tessuti umani. Devono essere valutate opzioni appropriate. Si ritiene improbabile che protocolli elaborati, richiedenti manipolazioni prolungate, siano diffusamente trasferiti nella pratica diagnostica di routine.

Una volta definiti i protocolli in studio, deve essere saggiata la loro efficienza con diluizioni contenenti inoculi (estesi sotto il limite di rilevamento nominale) contenenti aliquote di materiale campione e il controllo di cellule intere o di virus, procedendo poi all'estrazione. Oltre a definire il

protocollo che consente il rilievo del limite migliore, l'attenzione dovrebbe essere rivolta a qualsiasi effetto che agisca sul livello del segnale dei risultati della PCR real time. L'inibizione parziale può influenzare i limiti di rilevazione.

### **Ottimizzazione dell'estrazione associata al saggio di amplificazione**

I risultati delle prove precedenti devono essere valutati prima di richiedere l'opportunità di ottimizzazione del dosaggio. Per questo scopo può essere necessario considerare anche il volume del campione, le concentrazioni degli oligonucleotidi e altri parametri. Per conseguire un miglioramento delle prestazioni si possono utilizzare diluizioni di cellule intere o virus di controllo inserite nelle aliquote dei campioni. Una guida alla soluzione degli inconvenienti è descritta di seguito (Appendice 9).

## **6 Validazione Tecnica**

---

Utilizzando l'elenco dell'Appendice 4 (comprende una lista di controllo basata su STARD Initiative<sup>3</sup>) e la letteratura comprendente il MIQE<sup>4</sup> il Direttore del Progetto deve preparare un piano di validazione, considerando le seguenti indicazioni:

- Definire lo scopo e gli obiettivi dell'indagine. Per esempio, la valutazione può essere progettata per validare le prestazioni di un nuovo saggio o mirare a dimostrare che i risultati di un dosaggio modificato/corretto in modo consistente sono compresi nella tolleranza di quello originale.
- Identificare le esigenze di formazione al fine di garantire che tutti gli operatori coinvolti nella validazione possiedono adeguati livelli di competenza. Verificare che le registrazioni della formazione siano aggiornate per le procedure eseguite.
- Identificare ogni valutazione del rischio e del COSHH che è stato revisionato o scritto.
- Identificare lo standard o i materiali di riferimento, se disponibili, per consentire che il saggio sia standardizzato, favorire il confronto del saggio, consentire la sua stabilità nel tempo e l'uso dei controlli da validare.
- Identificare la disponibilità di standard o materiali di riferimento, se disponibili, che consentano la standardizzazione del saggio, facilitino il confronto, conseguano la stabilità del test da validare nel tempo e l'uso dei controlli da validare.
- Progettare uno studio analitico di validazione per saggiare la sensibilità e la specificità del test utilizzando DNA purificato. Ciò comprende il DNA di un'ampia gamma di ceppi/varianti del microrganismo bersaglio e una serie di ceppi o specie non correlate che possono essere presenti nel campione, ma che non devono generare un risultato falso positivo.
- Progettare uno studio clinico di validazione comprendente il quadro clinico (es. sorveglianza, screening, diagnosi clinica), la scelta degli elementi di confronto e le considerazioni etiche. Ricercare la popolazione in studio includendo tipo di paziente, definizione di caso, criteri di inclusione/esclusione e le impostazioni dello studio.
- Identificare le tipologie (es., campione, modalità di prelievo, trasporto e trattamento) e il numero di campioni da saggiare. Prendere in considerazione la necessità di includere positivi noti, negativi noti, positivi a basse e alte concentrazioni e campioni noti o probabilmente problematici (es., contenenti inibitori o marcatori con probabili reattività crociate) o rappresentativi di una particolare popolazione.
- Prendere in considerazione le tecniche statistiche per selezionare la dimensione del campione ed evitare distorsioni. Nella fase di progettazione è fondamentale considerare i



## Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

requisiti statistici per garantire che i risultati siano statisticamente significativi. I numeri necessari per soddisfare questo obiettivo non possono essere previsti in questo documento guida perché variano in funzione di un certo numero di fattori. Un'indicazione è riportata nell'Appendice 2.

- La progettazione per la validazione dovrebbe evitare discrepanze per errori analitici. Alcuni campioni possono fornire risultati discordanti con il nuovo saggio rispetto a uno standard di riferimento. Se si ripete solo l'analisi di questi campioni, si introduce un errore perché è probabile che la seconda determinazione produca risultati concordanti per alcuni di questi campioni. Per evitare distorsioni, devono essere riesaminati almeno lo stesso numero di campioni concordanti e discordanti.
- Considerare la documentazione sulla valutazione di fattibilità del test, compresa l'attuabilità del metodo, le informazioni provenienti dagli utenti, le difficoltà di implementazione.
- Pianificare in modo tempestivo lo studio di revisione della validazione, incontri per dettagli di minor rilievo, consenso per modifiche al piano di studio e di tutte le azioni concordate.
- Assicurarsi che siano in corso tutte le POS riguardanti le confezioni nuove o modificate o per i reagenti. Può essere necessario mantenere le SOP nuove o revisionate come bozze di lavoro mentre i loro contenuti sono in corso di validazione, garantendo che il COSHH e le valutazioni del rischio siano state aggiornate. Quando lo studio di validazione è stato completato le POS devono essere autorizzate come documenti interamente controllati.
- In alcuni casi i saggi possono essere progettati per diagnosticare una malattia per la quale è difficile ottenere consistente informazione clinica o per patologie rare (ad esempio, le febbri emorragiche virali). In questi casi l'uso dei test può essere giustificato per via del suo potenziale valore diagnostico, anche se non sono soddisfatti in modo completo i criteri di validazione descritti in questo documento. Nella validazione, le carenze del test devono essere documentate nel fascicolo di sviluppo allegato alla giustificazione, per ogni caso, di risultati insufficienti. In questa evenienza, per una validazione soddisfacente, dovrebbe essere tracciato un piano di completamento. Ad esempio, si possono avere a disposizione campioni post-implementazione o dare più affidamento all'utilizzo di campioni simulati accuratamente progettati.

## 7 Iter di Validazione

---

Molti dei compiti indicati possono essere eseguiti congiuntamente o come parte del saggio stesso quando sviluppato con un'adeguata pianificazione.

### Principi generali

L'accuratezza può essere espressa per mezzo della sensibilità e specificità, da valori predittivi positivi e negativi o, in modo analogo, dal quoziente diagnostico positivo e negativo. La determinazione dell'accuratezza richiede che il valore reale (determinata da uno standard di riferimento, se disponibile) del campione sia nota, come indicato nella Tabella II che definisce queste caratteristiche.

**Tabella II Definizioni**

|                      |     | Risultati Prova di Riferimento<br>(Standard di riferimento) |     |
|----------------------|-----|---|-----|
|                      |     | +ve   | -ve |
| Risultati nuovo test | +ve | VP  | FP  |
|                      | -ve | FN  | VN  |

VP = numero di veri campioni positivi

FP = numero di falsi campioni positivi

FN = numero di falsi campioni negativi

VN = numero di veri campioni negativi

Sensibilità =  $VP/(VP+FP)$

Specificità =  $VN/(VN+FP)$

Valore predittivo positivo =  $VP/(VP+FP)$

Valore predittivo negativo =  $VN/(FN+VN)$

Rapporto positivo di probabilità diagnostica =  $\text{sensibilità}/(1-\text{specificità})$

Rapporto negativo di probabilità diagnostica =  $(1-\text{sensibilità})/\text{specificità}$

Quando possibile, i campioni utilizzati dovrebbero comprendere valori positivi alti, medi e bassi (cioè reattivi), così come per quelli negativi. Se si usano solo campioni a positività elevata non è probabile che il saggio di sensibilità sia affidabile. L'Appendice 2 fornisce informazioni sulla programmazione di procedure sperimentali di validazione accettabili. L'interpretazione dell'accettabilità di un saggio che si avvale dei suoi risultati di validazione dipenderà necessariamente dalle prestazioni relative a quelle dei saggi alternativi e sulla situazione diagnostica, per esempio, per un VPN molto elevato sarà richiesto un test di screening.

### **Determinazione della sensibilità analitica (limiti di rilevazione)**

La sensibilità analitica del saggio è condizionata dalla capacità di rilevare una bassa concentrazione di analita in un campione biologico. Questo tipo di sensibilità è espresso come concentrazione (ad esempio, mg/ml o in copie di gene/50 milioni di cellule). La concentrazione rilevabile di valore inferiore esprime una maggiore sensibilità analitica.

La sensibilità analitica è anche conosciuta come "limite di rilevamento" o "concentrazione minima rilevabile", che rappresenta la più bassa quantità di sostanza che può essere distinta dall'assenza della stessa (cioè dal valore del bianco).

Quando sono disponibili controlli di riferimento dovrebbero essere utilizzati direttamente o indirettamente con la calibrazione dei controlli propri del laboratorio. La via indiretta è accettabile perché il materiale di controllo di riferimento è derivato da una vera fonte biologica e spesso è una risorsa preziosa.

Ai fini della validazione, la sensibilità analitica deve essere determinata dalla versione finale del saggio sviluppato e ottimizzato. Il limite di rilevamento deve essere espresso in unità accettabili (copie, ufc, ufp, genoma equivalenti ecc) per mL o per g di materiale campione come appropriato. Quando è stato definito uno Standard Internazionale dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), le unità devono essere calibrate nei confronti di questo reagente. Il limite di rilevamento è realizzato con almeno quattro serie di saggi eseguiti con tre replicati per saggio. Il limite di rilevamento può essere differente in differenti tipi di campioni. In modo convenzionale, il limite di rilevazione (LoD –limite di determinazione) è riferito come la stima del limite di rilevamento che può essere ottenuto con il 95% di confidenza. Questa determinazione richiede

## Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

l'analisi con la funzione Probit che coinvolge prove su campioni replicati attorno al punto limite del saggio, e l'elaborazione della percentuale di rilevamento ad ogni livello attraverso l'analisi statistica computerizzata<sup>5</sup>.

### **Specificità analitica**

La specificità analitica esprime la capacità di un saggio di identificare esclusivamente la sostanza bersaglio o il microrganismo e non le sostanze simili ma diverse (ad esempio HIV-1 invece di HIV-2) in un campione o preparato.

Questa caratteristica dovrebbe essere valutata il più presto possibile quando l'amplificazione del saggio prototipo ha dimostrato di funzionare. Per conseguire la validazione si devono saggiare le preparazioni di acido nucleico degli obiettivi bersaglio che possono essere riscontrati nei campioni. Questo dovrebbe includere la più ampia varietà dei diversi ceppi contenenti l'analita bersaglio (cioè positivi) facilmente ottenibili, e materiali privi di bersaglio (altri organismi e acido nucleico che possono essere riscontrati nel materiale campione per i quali si dovrebbe registrare esito negativo o non rilevabile).

### **Sensibilità diagnostica**

La sensibilità di un test esprime la capacità di rilevare persone con la condizione di interesse specifico in una popolazione, espressa in proporzione o percentuale come definito sopra (Tabella II).

La sensibilità diagnostica può dipendere più dalla possibilità di rilevare la sostanza bersaglio in un campione processato appartenente a una persona che ha la condizione prestabilita più che la capacità di rilevare concentrazioni molto basse di un analita.

### **Specificità diagnostica**

La specificità diagnostica esprime la capacità di un saggio a identificare correttamente una persona che non soffre della malattia in questione. La specificità diagnostica di un test esprime la probabilità che un saggio produca risultati veri negativi quando utilizzato su una popolazione non infetta.

### **Analisi quantitative**

Per valutare le prestazioni di analisi quantitative sono richiesti criteri aggiuntivi. Questi includono misurazioni basate sulla curva standard costruita utilizzando le diluizioni del materiale di controllo. Queste determinazioni includono la pendenza della curva, il campo lineare e le intercette X e Y. L'efficienza della PCR deve essere determinata come descritto nella sezione 'attività di base per lo sviluppo del test'. Per tutto l'intervallo lineare il coefficiente di variazione deve essere determinato con valori quantitativi o deviazione standard se si usano i valori di C<sub>q</sub>. Ciò è importante per definire le variazioni di rilievo clinico e per stabilire il livello quantitativo inferiore della soglia del saggio. Per la calibrazione delle analisi quantitative, quando disponibile, devono essere usati gli standard internazionali. Sono commercialmente disponibili anche standard quantitativi appropriati (ad esempio controlli quantificati di virus intero forniti da Accrometrix), tuttavia, i valori assegnati non avranno lo stesso valore degli Standard Internazionali. In alternativa, in materiale quantificato in house può essere generato sinteticamente (ad esempio nei plasmidi) o da preparazioni purificate del microrganismo. Questi standard prodotti in house possono essere quantificati con metodi adeguati, come la determinazione con assorbanza di A<sub>260</sub> o con coloranti in fluorimetria. L'intervallo quantitativo dovrebbe comprendere la dispersione dei risultati normalmente attesi dai campioni clinici. I risultati non dovrebbero essere estrapolati oltre l'intervallo dinamico lineare del saggio. La curva standard deve contenere quattro o cinque punti ed i valori superiori e inferiori degli standard entro 1 log dell'intervallo quantitativo riportato. I risultati positivi ottenuti sopra o sotto il limite di quantificazione (LoQ -Limit of Quantitation) devono essere riportati come "positivo, superiore a xx copie/ml" o rispettivamente come "positivo, inferiore a xx copie/mL",

Devono essere stabiliti appropriati controlli di prova da utilizzare per monitorare le prestazioni del dosaggio quantitativo quando utilizzato. Questi dovrebbero essere a un livello atteso per il saggio ed esprimere valori positivi affidabili, ma non a concentrazione significativamente superiore a un

## Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

tipico campione clinico rilevato da una specifica PCR real-time (es., come indicazione, il controllo deve esprimere un valore di C<sub>q</sub> 30). I controlli dei saggi consentono di monitorare nel tempo le prestazioni e la loro valutazione con le regole di Westgard (consultare Appendice 8).

### Linearità

La linearità di una procedura analitica è espressa dalla sua capacità (entro un determinato intervallo) di ottenere risultati che sono direttamente proporzionali alla concentrazione dell'analita presente nel campione. Dovrebbe essere considerato un rapporto lineare in tutto l'intervallo della procedura analitica. Questa caratteristica è dimostrata saggiando una serie di diluizioni di un campione noto.

La linearità dovrebbe essere valutata mediante l'osservazione visiva di un insieme di risultati in funzione della concentrazione dell'analita o del contenuto. Se esiste una relazione lineare, i risultati devono essere valutati con metodi statistici appropriati, per esempio, mediante il calcolo della retta di regressione con il metodo dei minimi quadrati. Si consiglia la consulenza di uno statistico se non si ha familiarità con i concetti matematici associati a questa procedura.

Per definire la linearità, si raccomanda un minimo di quattro concentrazioni.

### Intervallo di misura

L'intervallo di una procedura analitica esprime lo spazio compreso tra i limiti superiore e inferiore (ad esempio concentrazione, numero di organismi o numero di copie di DNA) presente nel campione per il quale è stato dimostrato che la procedura analitica ha un adeguato livello di precisione, accuratezza e linearità.

L'intervallo specificato deriva normalmente da studi di linearità e dipende dall'applicazione prevista dalla procedura. E' definito confermando che la procedura analitica fornisce un grado accettabile di linearità, accuratezza e precisione quando applicato a campioni contenenti quantità di analita compresi all'interno degli estremi dell'intervallo specificato.

### Precisione

La precisione può essere determinata da un test ripetuto su qualsiasi campione. La precisione di una procedura analitica esprime la concordanza (grado di dispersione) tra una serie di determinazioni ottenute dal campionamento multiplo dello stesso campione omogeneo nelle condizioni prescritte. Nota: la precisione non è la stessa dell'accuratezza poiché un test potrebbe essere preciso, ma non accurato.

La precisione può essere considerata a tre livelli: ripetibilità, precisione intermedia e riproducibilità. La 'Ripetibilità' esprime la concordanza tra risultati indipendenti e tra saggi eseguiti dallo stesso operatore in un breve periodo.

'La precisione intermedia' misura la variazione nell'ambito di un laboratorio per includere, ad esempio, prove effettuate in giorni diversi, da tecnici diversi con l'uso di strumentazione diversa. La 'Riproducibilità' comprende la concordanza tra le prove ripetute eseguite in laboratori diversi.

La precisione deve essere ricercata utilizzando campioni omogenei, autentici, cioè, che si comportano in modo molto simile agli eventuali campioni reali. Tuttavia, se non è possibile ottenere un campione omogeneo, la precisione può essere definita utilizzando campioni preparati artificialmente o una soluzione del campione.

La precisione di una procedura è generalmente espressa come varianza, deviazione standard o coefficiente di variazione di una serie di determinazioni.

Campioni positivi noti dovrebbero esprimere lo stesso intervallo di accettabilità di risultati se dosati 4 volte o più in una sola serie analitica e su almeno quattro serie diverse in giorni diversi. Con una pianificazione accurata il compito di raccolta di questi risultati può essere raggiunto durante

## Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

l'esecuzione di test analitici per la sensibilità. Questo livello di validazione non comprende la valutazione della riproducibilità espressa dalla concordanza tra i risultati indipendenti ottenuti con lo stesso metodo su materiali identici ma in condizioni diverse (operatori diversi, apparecchiature, laboratori diversi e/o dopo intervalli di tempo diversi). La determinazione della riproducibilità è espressa dalla deviazione standard qualificata con il termine 'riproducibilità' come deviazione standard della riproducibilità. Poiché c'è meno controllo delle variabili possibili nel determinare la riproducibilità rispetto alla ripetibilità, ci si può aspettare che la deviazione standard di riproducibilità sia maggiore della deviazione standard di ripetibilità. Deve essere considerato un confronto di precisione tra piattaforme, specialmente se più di una di queste (estrazione e/o amplificazione) è opzionale, per es. per scopi di emergenza, come durante un guasto della strumentazione o eccesso di richiesta.

Gli studi di riproducibilità devono essere inclusi nel documento di validazione se si presuppone che il metodo diagnostico sia 'adottato' da altri laboratori.

### **Accuratezza analitica**

Campioni noti negativi e positivi (dotati di documentazione nota o valori accertati con test di riferimento) dovrebbero fornire lo stesso intervallo di accettabilità dei risultati, se estratti e determinati per 4 o più volte in una sola serie analitica (con almeno tre repliche per consentire anche di valutare la riproducibilità intra-saggio) e su almeno quattro diverse serie analitiche eseguite in giorni diversi. Con una pianificazione appropriata questa valutazione può essere ottenuta durante l'esecuzione dei saggi analitici per la sensibilità.

### **Accuratezza clinica**

La validazione richiede un confronto del saggio con un appropriato "standard di riferimento" utilizzando campioni clinici sequenziali. Il numero di campioni da esaminare varia in funzione della disponibilità di materiali clinici idonei. Questi dovrebbero, ove possibile, comprendere un ampio intervallo di concentrazioni dei campioni positivi e di quelli negativi. Dovrebbe essere consultato un esperto per discutere le possibili analisi statistiche da eseguire.

### **Robustezza**

La robustezza del dosaggio può essere valutata modificando deliberatamente alcune condizioni del protocollo percepite come fattori sensibili in grado di modificare il risultato, per esempio, simulando errori di pipettaggio che incidono su composti critici, come enzimi e Mg<sup>++</sup>, o prolungando la conservazione della miscela di reazione PCR a temperatura ambiente o a 4° C prima dell'amplificazione. Può essere importante inserire tali dati nel fascicolo di validazione, se si ritiene che possa essere utile per la risoluzione di eventuali problemi.

### **Intervalli di riferimento per le quantità da analizzare e descrizione dell'appropriata popolazione di riferimento**

Gli intervalli di riferimento, noti anche come range di riferimento, range normali o limiti di riferimento, sono riferiti ai livelli superiore e inferiore di analita che ci si attende di riscontrare in una popolazione normale. Tutti i valori superiori o inferiori sono al di fuori dei limiti normali. Gli intervalli di riferimento non sono rilevanti se il saggio è progettato per ricercare la presenza di un bersaglio (cioè un test qualitativo), ma lo sono quando lo scopo del saggio è di determinare se il paziente o il campione è all'interno o all'esterno dell'intervallo normale. Gli esempi possono includere concentrazioni anticorpali per un saggio di sierologia o la carica virale dell'HIV. Un altro esempio è fornito dal saggio di sensibilità agli antibiotici, per il quale è importante conoscere la concentrazione di antibiotico che inibisce i microrganismi sensibili, oltre la quale l'organismo è ritenuto resistente.

### **Informazioni richieste per controllare le interferenze specifiche conosciute**

Questo requisito richiede la conoscenza del campione biologico che sarà utilizzato per la prova. Cos'è presente o potrebbe essere contenuto nel campione in grado d'interferire con il risultato

Protocolli UK | P 4 | Emissione no: 1 | Data emissione 01.02.13 | Pagina: 21 di 49

del test? Può essere possibile controllare le interferenze causate dal pre-trattamento dei campioni. È essenziale includere controlli appropriati positivi e negativi per garantire il rilevamento della presenza di possibili interferenze. Queste possono essere identificate durante lo sviluppo del saggio e/o la sua validazione quando si utilizzano campioni ad attività nota.

### **Limiti del metodo**

È importante conoscere i limiti del saggio. Questi possono essere noti grazie alle conoscenze derivate dall'esperienza generale o essere identificati nel corso della validazione. Esempi possono essere la mancanza di sensibilità rispetto a un altro metodo, o se si utilizzano determinati tipi di campioni; possibili falsi risultati nei campioni contaminati.

### **Validazione clinica e implementazione nei percorsi diagnostici**

La validazione analitica garantisce che il saggio chimico rilevi in modo affidabile il bersaglio. La validazione diagnostica assicura che il test rileva il bersaglio nei campioni clinici ed è stato progettato per dimostrarne l'idoneità per l'uso su questi materiali. Il passo successivo è quello di integrare il saggio nella routine clinica come parte di un percorso clinico. Questo inizia con l'insieme delle indicazioni cliniche che portano il paziente all'esame e comprende l'intervallo previsto dei risultati e i dettagli di gestione del paziente funzionali ai risultati (vale a dire, stabilire flussi di lavoro in modo che la prova sia effettuata in un momento appropriato del ciclo diagnostico, quella prestazione è attivata da specifici quesiti clinici per i quali i risultati sono interpretati in modo che questi abbiano una ricaduta sul trattamento del paziente).

La validazione clinica può essere eseguita in modo retroattivo o prospettico. Può essere utile per stabilire una valutazione prospettica una volta che il saggio è implementato per aggiungere risultati al fascicolo. Il fascicolo di validazione deve includere informazioni sulle situazioni cliniche che fanno richiedere l'uso del test e l'interpretazione clinica appropriata dei risultati riferibili all'identificazione del patogeno. Nella refertazione dovrebbero essere forniti adeguati commenti in relazione ai risultati di particolari situazioni cliniche. Risultati positivi con alti e bassi valori in diversi campioni possono avere implicazioni diverse nei diversi contesti clinici (ad esempio il citomegalovirus (CMV) può essere presente in un campione, ma non essere causa di malattia). In questo modo la validazione clinica potrà informare quando il risultato è clinicamente rilevante.

Il US Patient-Centered Outcomes Research Institute (PCORI) Methodology Committee ha pubblicato gli standard per PCOR<sup>6</sup> e standard per la 'Progettazione, conduzione e valutazione di saggi diagnostici'<sup>7</sup>. Tali standard si riferiscono alla validazione clinica di saggi e il loro inserimento nei percorsi clinici. Si tratta di una risorsa utile che dovrebbe essere presa in considerazione quando si pianificano studi di validazione clinica.

### **Scadenza dei materiali**

Tutti i reagenti diagnostici commerciali riportano la data di scadenza sulle confezioni. Queste sono state determinate da studi di conservabilità. È importante sapere per quanto tempo un reagente rimane attivo. L'attività potrebbe decadere gradualmente e fornire ancora un risultato accettabile con il campione del controllo di qualità (CQ), ma può non funzionare in modo ottimale.

Il principio degli studi sul periodo di scadenza dei materiali è semplice. In primo luogo si deve determinare la temperatura da proporre per la conservazione. Può essere necessario determinare la scadenza in un intervallo di temperature, ad esempio  $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e a temperatura ambiente ( $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Conservare poi i campioni dei reagenti alla temperatura desiderata(e) per un determinato periodo, con controllo periodico dei campioni utilizzando un CQ noto, per determinare il tempo in cui i reagenti rimangono al proprio livello ottimale. La BS EN 13640<sup>8</sup> richiede che la prova di conservazione dei materiali sia eseguita su campioni provenienti da tre lotti diversi. Si sono rivelati accettabili due approcci diversi. Questi sono descritti nell'Appendice 3, che considera anche l'analisi dei vantaggi e degli svantaggi dei due metodi per la determinazione della prova di scadenza dei materiali.

## Studi sul periodo di scadenza dei materiali in condizioni di stress

Gli studi sul periodo di scadenza dei materiali determinano la stabilità dei reagenti in condizioni controllate (es 2-8° C). Tuttavia, nel corso della loro vita, i reagenti possono essere sottoposti ad altre condizioni, quali, temperatura ambiente durante la consegna in altra sede e/o stazionamento sul banco; congelamento-scongelo una o più volte durante il periodo di validità dei reagenti. È importante considerare le possibili condizioni in cui possono essere sottoposti durante il loro periodo di validità e il tentativo di riprodurle in laboratorio per verificare se sono coinvolte le loro prestazioni. È necessario eseguire solo studi di stress su un lotto di reagente.

Se i reagenti possono essere sottoposti a congelamento-scongelo più volte durante il loro periodo di vita, si possono selezionare differenti aliquote, esporle a una serie di cicli di congelamento-scongelo e sottoporle di nuovo al saggio. I campioni possono essere saggiati dopo ogni scongelamento congelamento o possono essere conservati e saggiati contemporaneamente per consentire un agevole confronto e controllo.

Se i reagenti devono essere inviati a un altro laboratorio, questi potrebbero essere lasciati in un deposito caldo durante la notte nel corso di un'ondata di caldo. Pertanto, si potrebbe prendere in considerazione di ripetere il test dopo aver sottoposto un campione a 25°C per 24 ore o a qualsiasi temperatura e tempo si ritenga appropriato.

Se, dopo gli studi di stress, i reagenti non risultano stabili dopo diversi cicli di congelamento-scongelo, le istruzioni per l'uso dovranno indicare chiaramente questa condizione segnalando di evitare congelamento-scongelo del materiale. Per i reagenti che richiedono di essere conservati congelati, le istruzioni potrebbero richiedere la necessità della loro eliminazione dopo l'uso.

Se gli studi di stress dimostrano che i reagenti non sono stabili quando conservati a temperatura diversa ad esempio, da 2-8° C, questi devono essere consegnati su ghiaccio e le istruzioni devono indicare con chiarezza che richiedono una conservazione a temperatura appropriata quando non sono in uso.

È allegata un'indicazione per la risoluzione dei problemi (Allegato 9).

## 8 Valutazione del rischio

---

Per ridurre al minimo l'esposizione degli utenti e dei pazienti è essenziale che la valutazione del rischio sia effettuata prima di utilizzare qualsiasi reagente di un saggio diagnostico<sup>9</sup>. Questa deve considerare, ad esempio, quello da infezione dai materiali, qualora contengano sostanze biologiche, in tutte le diverse combinazioni in cui potrebbero essere utilizzate, quali piattaforme o reagenti accessori diversi. In funzione dei rischi identificati, le azioni successive possono essere volte a garantire che siano state predisposte adeguate misure di controllo. Queste potrebbero includere l'inattivazione di un reagente, revisione degli studi di stress; revisione della conservazione dei reagenti quali, temperatura o tipo di contenitore utilizzato, consentendo di fornire maggiori informazioni nelle istruzioni per l'uso.

## 9 Analisi dei Risultati e Formulazione del Rapporto Tecnico

---

La relazione tecnica e la cartella di validazione dovrebbero riassumere il saggio di validazione, i risultati e le raccomandazioni. Quest'attività comprende anche lo sviluppo delle regole di Westgard utilizzando i risultati dei controlli positivi eseguiti secondo i criteri delle SOP di routine, vale a dire sufficienti controlli positivi eseguiti nelle serie analitiche per l'accuratezza clinica.

Per i saggi in-house, la validazione può essere sostenuta da attività di ricerca e sviluppo eseguite nel corso della definizione delle procedure. Se appropriato, le registrazioni delle cartelle di lavoro possono presentare riferimenti crociati con il rapporto di validazione.

L'attività di validazione dovrebbe essere completata in conformità allo schema e i risultati registrati nell'apposita cartella.

I risultati devono essere analizzati come definito nel programma di studio. Questi sono confrontati con i valori attesi per determinare se la confezione o reagente sono idonei all'uso. Ciò può includere il confronto con risultati che utilizzano reagenti alternativi e, per le confezioni commerciali, con le informazioni sulla sensibilità e specificità fornite dal produttore.

## 10 Revisione della Relazione Tecnica e Firma

---

I risultati della validazione devono essere presentati in una relazione scritta, in modo che i revisori possano valutare se il saggio è o non è idoneo allo scopo (come concordato nella Definizione del Saggio).

La conclusione deve essere documentata sulla base dell'analisi dei risultati. Questa deve includere una dichiarazione ufficiale che il saggio è adatto all'uso e deve essere firmato dal Capo Progetto e dal Responsabile del Progetto.

La validazione deve essere compilata e firmata prima di qualsiasi uso della confezione o del reagente per scopi diagnostici o di riferimento. Ogni altro uso prima di firma deve essere segnalato come per esclusivo uso per ricerca. La validazione deve essere compilata in modo tempestivo per rispettare e non compromettere la scadenza del processo di validazione.

## 11 Istruzioni per l'Uso

---

Tutti i saggi devono avere le istruzioni per l'uso. Questa può essere una SOP di accompagnamento, o una scheda-prodotto (PIS – product information sheet) in dotazione con i reagenti se spediti ad altri laboratori. I requisiti della direttiva IVDD (In Vitro Diagnostic Device) includono prescrizioni molto dettagliate di ciò che dovrebbe essere incluso nel PIS. Può essere consentita una certa flessibilità sui requisiti IVDD per test in house.

## 12 Requisiti per Etichettatura

---

I requisiti per gli IVDD comprendono prescrizioni molto dettagliate di ciò che dovrebbe essere indicato sulle etichette dei reagenti. Una certa flessibilità può essere ammessa per i saggi in house. Tuttavia, il requisito minimo è il nome del reagente, il numero di lotto e la data di scadenza, che deve essere chiaramente identificabile.

## 13 Produzione e Conservazione dei Documenti

---

Le linee guida del Royal College of Pathologists (RCPATH) stabiliscono che l'insieme della documentazione deve essere conservata almeno 10 anni. Sebbene le linee guida non chiariscano a quale documentazione ci si debba riferire, l'insieme della documentazione riguardante i saggi in house deve essere mantenuta in archivio per il tempo indicato in precedenza. La documentazione da conservare è costituita dalle specifiche di acquisto e produzione di ogni reagente, compresi i numeri di lotto dei reagenti, i dettagli sull'utilizzo della strumentazione, come è stato prodotto il reagente e tutte le modifiche effettuate. Tutti i reagenti devono essere prodotti, conservati e utilizzati nell'ambito del sistema di qualità di laboratorio e si deve disporre di sufficienti registrazioni per consentire una verifica completa.

## 14 Validazione di Saggi Pronti all'Uso

---

Una volta completata la validazione in modo soddisfacente usando una SOP definita, è indispensabile che il saggio sia eseguito secondo le indicazioni della SOP. Si possono inserire lievi modifiche non rilevanti sulle specifiche prestazioni del dosaggio, ma, per quanto possibile, dovrebbero essere inserite all'interno degli elementi di prova disponibili forniti dalla SOP. Per esempio, può essere meglio specificare l'uso di acqua distillata, deionizzata o di grado molecolare piuttosto che una particolare marca di acqua di grado molecolare. In modo analogo,



può essere ragionevole evitare di specificare il modello particolare di strumento da utilizzare per la PCR.

Nel caso di modifiche al protocollo che esulano dalla SOP è richiesta una nuova procedura di validazione. La nuova validazione varierà da una singola serie analitica che evidenzia valori C<sub>q</sub> immutati per una serie di campioni di riferimento (ad esempio come potrebbe essere appropriato per un cambiamento di un tampone) a una completa procedura per una nuova validazione (ad esempio per l'utilizzo di un metodo alternativo di preparazione del campione o cambiamento del primer). L'Appendice 6 fornisce una guida per il livello di rivalidazione che può essere considerato accettabile per una serie di modifiche al protocollo.

Saggi in uso con registrazioni di validazione non conformi ai requisiti del presente documento di indirizzo devono essere retroattivamente dotati di una raccolta di documentazione di conformità per la validazione, quando possibile. I documenti datati dovrebbero essere revisionati e riassunti per fornire la prova che il saggio è idoneo allo scopo e l'elenco di validazione deve essere usato come riferimento crociato con questi documenti. Questo vale anche per i saggi non commerciali adottati da un altro laboratorio.

Non può essere richiesto un successivo lavoro di validazione, anche se i risultati disponibili sono insufficienti a fornire una raccolta di documenti compatibile con la validazione. Tuttavia, può essere necessario implementare un'appropriata raccolta di risultati per fornire informazioni di supporto.

Deve essere disponibile una conclusione che si avvale delle informazioni ottenute dai risultati storici. Questa deve includere una dichiarazione ufficiale che il saggio è idoneo all'uso.

## **15 'Immissione sul Mercato' del Saggio**

---

La raccolta dei risultati per la validazione diagnostica coinvolgerà necessariamente una tecnica di 'immissione del saggio' limitata all'interno del laboratorio di progettazione. L'adozione completa del nuovo saggio nell'uso clinico dovrà tener conto della disponibilità della fornitura di reagenti e delle modalità di valutazione della qualità, comprendendo l'AQE, se appropriato. Se il saggio può soddisfare le esigenze di un vasto numero di utenti finali, si può considerare la sua introduzione nel mercato. Per questa finalità, il piano dovrebbe includere tempistica, attrezzature, personale e proposte di gestione del rischio. Se il saggio è destinato a fini diagnostici clinici, devono essere soddisfatti i requisiti della Direttiva Europea e, se il saggio deve essere reso disponibile per l'uso al di fuori del laboratorio che lo ha progettato, è richiesta la marchiatura CE, apposta sulle confezioni o sui materiali di controllo.

Dopo l'immissione sul mercato deve essere eseguito uno studio di verifica del saggio e una valutazione continua della qualità. Questo dovrebbe essere organizzato dal laboratorio di sviluppo o da una terza parte qualificata (ad esempio, un'istituzione di AQE). La verifica dovrebbe comportare la sperimentazione di pannelli di validazione o essere limitato a pochi campioni ben caratterizzati e agli standard. In alcune circostanze, può essere opportuno che i materiali per la validazione siano prodotti da laboratori diversi da quello dello che ha sviluppato il saggio. Il metodo Round-robin può essere utile nel garantire attenzione costante alla qualità.

## **16 Produzione di Reagenti per Uso di Routine**

---

Seguendo lo sviluppo di un test soddisfacente è essenziale che le procedure per la produzione dei reagenti per uso di routine siano chiaramente definite per garantire che lo stesso continui a essere idoneo allo scopo quando si producono successivi lotti. Deve essere predisposta una SOP(s) che descriva il processo di produzione in modo dettagliato, comprendendo informazioni specifiche su reagenti, strumentazione e condizioni. Se appropriato, i fogli di lavoro devono essere predisposti per consentire la registrazione di tutte le informazioni della produzione per consentire una ricostruzione completa del processo di fabbricazione di ogni lotto.

La(e) Procedura Operativa Standard (SOP) deve includere informazioni di come è stata controllata la qualità del prodotto intermedio (se necessario) e finale(i) prima del rilascio dei lotti. Deve essere predisposto un foglio di lavoro per consentire la registrazione dei risultati del controllo di qualità che dovrebbe comprendere il rilascio dei lotti finali, firmati da un responsabile.

Tutto il personale coinvolto nella preparazione dei reagenti deve essere adeguatamente addestrato/possedere la documentazione della propria competenza.

## 17 Sorveglianza e Verifica Post-Implementazione

---

La definizione 'Post-implementazione' è equivalente al termine del 'post-commercializzazione' nella letteratura IVDD e in altre normative.

Quando il saggio è stato validato e inserito nell'uso, si devono ancora raccogliere informazioni, quali quelle sulle sue prestazioni. Devono essere documentate le caratteristiche riguardanti ogni problema, quali scarse prestazioni, falsi positivi o negativi. Si devono esaminare tutti i problemi e intraprendere le opportune azioni correttive. E' importante diffondere una tempestiva comunicazione a tutti gli altri utenti del saggio o di test simili, per informarli di ogni problema e come parte principale dell'azione correttiva. Se necessario, la valutazione dei rischi deve essere riveduta in funzione delle nuove informazioni acquisite. Tutte queste devono essere incluse nel fascicolo del progetto (nella parte che prevede lo sviluppo del saggio e nella cartella del controllo), che non è un'entità statica, ma deve essere sempre aggiornata con tutte le informazioni disponibili. Queste dovrebbero essere condivise con i laboratori che eseguono il test.

Il saggio deve essere riesaminato periodicamente per garantire il miglioramento continuo e per evidenziare le prestazioni ottenute rispetto a quelli alternativi, commerciali o in-house. Le revisioni periodiche devono comprendere la verifica delle sequenze nucleotidiche diverse eventualmente disponibili, e la revisione della letteratura scientifica per l'identificazione di nuovi ceppi o varianti. I risultati delle revisioni devono essere inclusi nella SOP dei saggi.

## 18 Documentazione

---

Tutti i documenti riguardanti lo sviluppo e il monitoraggio delle prestazioni del test devono essere conservati in modo da essere facilmente recuperati e verificati. Si deve avere una cartella in cui tutti i relativi documenti sono archiviati o segnalati i riferimenti pertinenti.

Completare il foglio di lavoro (Allegato 5) per ciascun test e conservarlo nella cartella di validazione. Se le informazioni principali sono già state documentate, non è necessario trascriverle sul modulo, segnalare il documento pertinente. L'elenco dei documenti appropriati è specificato nell'Appendice 5, Riassunto della Relazione di validazione di una confezione o reagente.

Il Capo Progetto o il Responsabile del Progetto deve controllare i risultati, completare l'elenco del controllo di validazione, firmare la sezione di validazione dell'autorizzare al rilascio di una confezione nuova o modificata o reagente o garantire che sono state fornite informazioni sufficienti atte a confermare che la confezione o il reagente già in uso è idoneo allo scopo.

La relazione dipartimentale deve essere titolata in modo da contenere un riferimento che consenta il riconoscimento di tutte le pagine. Si raccomanda che il numero di riferimento della relazione sia contrassegnato con NNN/YY, vale a dire, i primi tre numeri caratterizzano una sola pagina, con progressione di uno per pagina, seguiti da una cifra che identifica l'anno, es, 001/06, 002/06. ecc.

Come da accordi intercorsi con la Health Protection Agency, la presente traduzione è a cura del Dott. Roberto Rescaldani, già Direttore del Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Ospedale Universitario San Gerardo dei Tintori di Monza.

Verifica della traduzione: Prof. Clementina Cocuzza e Dr. Rosario Musumeci, docenti di Microbiologia e Microbiologia Clinica presso la Scuola di Medicina dell'Università di Milano Bicocca

## Appendice 1 - Progettazione e Implementazione dei Controlli Interni (CI)

I problemi di PCR diagnostica che sono più ingestibili in termini di risultati falsi negativi sono imputabili alla mancata estrazione e alla inibizione della reazione. L'efficienza dell'estrazione dell'acido nucleico bersaglio dipende dalla tipologia del microrganismo e dal protocollo di estrazione utilizzato e quindi è molto variabile. Non è prevedibile la presenza di un fattore inibente nel campione, e ciò può presentarsi in uno o più campioni all'interno di un lotto anche in assenza di qualsiasi errore tecnico. La mancata estrazione e l'inibizione della reazione sono molto più frequenti nei campioni clinici sottoposti a test diagnostici primari rispetto a quelli secondari.

Di solito si raccomanda l'applicazione di appropriati controlli che facilitino l'identificazione di risultati falsi negativi, in particolare quelli concernenti la mancata estrazione e/o la inibizione della reazione e che devono sempre essere inclusi nelle PCR predisposte per la diagnosi clinica i cui risultati condizionano la gestione del paziente o importanti decisioni riguardanti la salute pubblica<sup>5,10</sup> e sono implicitamente o esplicitamente richiesti negli standard esterni (ISO, UKAS, CPA) e interni (UK SMI).

Per l'individuazione di risultati falsi negativi sono disponibili vari tipi di controlli PCR, che conferiscono diversi livelli di sicurezza<sup>11-14</sup>. Questi sono riassunti nella Tabella I. Si deve rilevare che la scala è arbitraria e il grado di affidabilità complessiva dipende anche dalle fasi della PCR che sono poste sotto controllo (estrazione, reazione e inibizione).

**Tabella I: Categorie di controlli PCR per la ricerca di falsi negativi**

| Metodo   | Livello generale di sicurezza |
|--|-------------------------------|
| Controllo interno con gli stessi amplicon (controlli simulati) | Buono                         |
| Controllo interno con amplicon diversi (non-simulati)          | Buono                         |
| Controllo interno endogeno (es, gene costitutivo)              | Buono                         |
| Controllo esterno amplificato in parallelo con doppie reazioni | Accettabile                   |
| Semplice controllo esterno al lotto                            | Ridotto                       |

Nella Tabella II sono riassunti i diversi approcci generali. Questi possono essere classificati in base al livello generale di sicurezza conferito, giudicato in base ai metodi di controllo utilizzati per l'estrazione e/o inibizione e la robustezza del metodo usato. Il livello di affidabilità si avvale di una scala arbitraria. In generale, sono stati ritenuti capaci di conferire un buon livello di affidabilità i metodi che utilizzano controlli robusti (quale l'uso di CI nei saggi multiplex) sia nei confronti della inibizione che per l'estrazione. I metodi che utilizzano controlli per inibizione ed estrazione meno robusti (quali i controlli esterni associati a CI) sono ritenuti in grado di conferire un livello accettabile di sicurezza. I metodi che non utilizzano CI, ma solo controlli esterni sono giudicati in grado di conferire un basso livello di affidabilità. Si deve notare che talvolta i saggi possono non richiedere controlli per un risultato falso negativo (saggi di tipizzazione aventi una sequenza di basi come endpoint in cui un "negativo" implica necessariamente un saggio difettoso che deve essere ripetuto).

**Tabella II: Riassunto dei metodi di controllo**

| Controllo estrazione   | Controllo inibizione  | Grado di sicurezza |
|--|---|--------------------|
| Controllo (fago rivestito di RNA e/o DNA come appropriato) inserito in ogni campione | Estratto acido nucleico positivo in alcune provette                                     | Buono              |
| DNA umano indice di campione di buona qualità  | Estratto saggiato come campione umano intrinseco nella stessa provetta                  | Buono              |
| Bersaglio generico (saggio per tipizzazione o variante genica)                       | Target generico riscontrato nella stessa provetta                                       | Buono              |
| Cellule di controllo positive estratte in provette diverse                           | Controllo positivo aggiunto a ogni campione rilevato nella stessa provetta              | Buono              |
| Nessun controllo per l'estrazione  | Controllo positivo aggiunto a ogni campione rilevato nella stessa provetta              | Accettabile        |
| DNA di controllo (es. plasmide) inserito in ogni campione                            | Estratto saggiato come campione umano intrinseco in provetta in parallelo               | Accettabile        |
| DNA umano indicativo di campione di buona qualità                                    | Estratto saggiato per la presenza di campione umano intrinseco in provetta in parallelo | Accettabile        |
| Estrazione di acido nucleico saggiato in parallelo                                   | Test di inibizione con saggio in parallelo  | Bassa              |
| Controllo estrazione del lotto   | Estratto saggiato per poche copie di campione inserite in una provetta parallela        | Bassa              |
| Nessun controllo per estrazione  | Estratto saggiato con copie di campione inserite in una provetta parallela              | Bassa              |

|  |                   |  |                   |
|--|-------------------|--|-------------------|
|  | Controlli interni |  | Controlli esterni |
|--|-------------------|--|-------------------|

### Controlli esterni

I controlli esterni utilizzano materiale di riferimento in una reazione PCR eseguita in parallelo. Nella sua forma più semplice, il controllo esterno utilizza una o più provette a concentrazione nota inseriti in ogni serie analitica di un certo lotto. In alternativa, il controllo esterno può essere ottenuto eseguendo coppie di reazioni parallele delle quali una provetta serve come controllo. L'uso dei controlli esterni (controlli paralleli) presenta il vantaggio che la reazione PCR di controllo non può interferire con l'accuratezza del saggio e che l'amplificato di controllo non deve essere distinto da quello del saggio. Per questo motivo i controlli esterni sono molto semplici da progettare e realizzare.

Tuttavia, esistono due principali svantaggi rispetto al CI. Cioè, il numero di reazioni di PCR impostate risulta essere il doppio. Inoltre, anche di maggior importanza, non essendo loro CI, permane la potenziale possibilità di falsi negativi, dovuti a inibizione del campione, sebbene questa eventualità è notevolmente ridotta.

### Controlli interni

Diversamente dai controlli esterni che sono eseguiti in una provetta di reazione parallela, il CI sfrutta la possibilità di reazioni della PCR di tipo multiplo utilizzando una seconda molecola bersaglio che può essere amplificata, con altri prodotti della reazione presenti nella stessa provetta di reazione, rimanendo facilmente distinguibile da questi ultimi.

Nel saggio PCR la sequenza ideale del CI dovrebbe prevedere un controllo per tutte le procedure, i reagenti e campioni inclusi nel saggio e quindi essere presente in tutti i campioni

## Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

prelevati correttamente, dovrebbe essere rilasciata dallo stesso comparto cellulare come la sequenza bersaglio nelle condizioni di estrazione, non dovrebbe essere amplificato in modo competitivo utilizzando gli stessi primer della sequenza bersaglio e dovrebbe anche produrre un amplicone di dimensioni identiche con analogo contenuto di GC, in modo che possa essere facilmente distinto. Anche se è raramente possibile raggiungere questa condizione ideale, sono tuttavia preziosi i CI anche se non ottimali.

Un CI semplice per evidenziare l'inibizione di reazione potrebbe coinvolgere l'aggiunta di un'appropriata concentrazione di DNA del CI nella master mix di PCR. Il CI che verifica sia la mancata estrazione che l'inibizione della reazione potrebbe comprendere l'aggiunta della sequenza CI, o qualsiasi forma di acido nucleico bersaglio di controllo che richiede l'estrazione nel campione prima della fase di estrazione. L'aggiunta di questo DNA dovrebbe comprendere una discreta quantità di acido nucleico esogeno nel campione ad una concentrazione nota.

Il CI inserito può essere progettato per essere simile alla molecola della sequenza bersaglio. Le sequenze simulate sono generalmente dotate di siti di iniziazione della reazione identici a quelli del bersaglio e le sequenze interne a questi iniziatori devono differire soltanto nella misura necessaria a consentire la discriminazione diretta dal bersaglio. La possibilità di differenziazione tra la sequenza autentica utilizzata e quella imitata dipende dal metodo di analisi usato. Con l'elettroforesi su gel, l'amplicone del CI deve essere di dimensione sufficientemente diversa dall'amplicone bersaglio per consentire una chiara differenziazione. Tuttavia, quando è disponibile un sistema con sonda per analisi di tipo *real time* (es. sonde TaqMan), può essere sufficiente anche la differenza di una singola base tra CI e bersaglio. Lo svantaggio di un CI a struttura molecolare simile al bersaglio risiede nel legame competitivo del primer e l'inibizione per retroazione dovuto all'appaiamento dell'amplicone eterologo (che porta alla soppressione della popolazione minore). Se si ritiene che questo sia un problema significativo, la migliore alternativa è di utilizzare un CI con caratteristiche simili al bersaglio (come lunghezza, contenuto di guanina-citosina, temperatura di separazione della doppia elica) ma che richieda diversi e che siano sufficientemente dissimili in modo tale che non si possa verificare l'appaiamento con le sequenze bersaglio del CI.

La distribuzione del CI nel saggio necessita di qualche considerazione, specialmente quando è aggiunto a un campione complesso prima estrazione degli acidi nucleici bersaglio. L'aggiunta di DNA a doppio filamento nudo che comprende la sequenza del CI, in forma lineare, a cerchio aperto o superavvolta, ai campioni immediatamente prima o dopo l'aggiunta del tampone di 'lisi' (cioè qualsiasi soluzione aggiunta al campione per promuovere la lisi cellulare o separare e allontanare le proteine dagli acidi nucleici o per preparare l'acido nucleico mediante l'adsorbimento su un supporto solido) non dovrebbe essere problematica e dovrebbe comportare un recupero non preferenziale della sequenza del CI associata alla sequenza bersaglio. Tuttavia, quando è necessario aggiungere il CI come RNA (ad esempio, quando il saggio è studiato per rilevare un virus a RNA) di solito si eseguono altre operazioni per evitare l'azione della ribonucleasi che può influenzare l'integrità della sequenza, specialmente durante la conservazione a lungo termine del materiale di controllo o per produrre di un trascritto di RNA resistente alla RNasi. Una possibilità è quella di preparare un controllo di RNA sotto forma di "RNA blindato" (cioè RNA rivestito con proteina dell'involucro del batteriofago MS2, un prodotto commerciale che può richiedere la licenza per l'uso nei sistemi diagnostici) o utilizzare prodotti come RNAlater™ (soluzione concentrata di solfato d'ammonio).

Un'alternativa frequente, appropriata per alcuni campioni, è quella di usare come controllo una sequenza di acido nucleico dell'ospite come bersaglio. In questo caso, tutti i campioni prelevati in modo appropriato saranno positivi per il controllo. Per la diagnosi di infezioni nell'uomo è importante che il campione sia adeguato e ciò può comportare che siano presenti cellule umane. Di conseguenza, può essere vantaggioso (o almeno accettabile) utilizzare un gene umano come CI in saggi destinati a rilevare agenti infettivi. Un vincolo a questo approccio richiede che la quantità di CI presente dipenda dalla qualità del campione, che può essere molto variabile. È pertanto importante verificare che quando sono presenti elevate quantità di amplicato del CI, l'amplicato del bersaglio non sia mascherato dall'eccesso di CI, mentre si richiede la conservazione di un adeguato segnale del CI quando ne sono presenti scarse quantità nel campione. In generale, dai riscontri che evidenziano come il DNA umano sia presente in grande quantità nei campioni dei tessuti prelevati in modo corretto e appropriato, la migliore soluzione al

## Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

problema suggerisce un compromesso in cui si depotenzia il CI della PCR (es., riducendo la concentrazione di uno o di entrambi i primer) per impedire che la quantità di amplicone del CI raggiunga livelli elevati che inibiscono l'amplificazione del bersaglio.

Quando un saggio PCR è progettato per il rilevamento di un particolare tipo di agente patogeno noto per essere presente in un campione, deve essere inserito nel test un controllo appropriato. Per esempio, nel saggio in cui un amplicone è sequenziato, le basi invariabili, che sono sempre presenti, forniscono un adeguato CI. In alternativa, quando il patogeno è noto, i geni conservati nel suo genoma possono essere utilizzati come CI in una reazione multipla con l'amplificazione della sequenza bersaglio del test.

### Valutazione del rischio

La valutazione dei rischi con l'uso di controlli per il saggio PCR in-house è riassunta nella tabella III. Il punteggio del rischio deriva da una valutazione arbitraria conseguente a un risultato falso negativo e dalla probabilità di ottenere tale risultato. L'impatto di un falso negativo è considerato più elevato per campioni che interessano l'assistenza dei pazienti, per quanto riguarda la diagnostica primaria o di conferma, ed è meno rilevante per la tipizzazione a fini della sorveglianza. La probabilità di un falso negativo è considerata maggiore per i campioni primari, è dovuta alla diversa densità del bersaglio, è influenzata del metodo di campionamento e dal rischio di estrazione inefficiente e dalla reazione d'inibizione. La probabilità è inferiore per i campioni secondari dovuta alla maggior densità del bersaglio ed estrazione e inibizione prevedibile e inferiore per saggi di tipizzazione applicati a campioni noti per essere positivi per il microrganismo bersaglio. Il grado di affidabilità conferita dai controlli informa sulla riduzione necessaria richiesta per la gestione del rischio.

**Tabella III: Valutazione del livello di Rischio per il saggio PCR**

| Amplificazione PCR   | Impatto di un falso-negativo* | Probabilità di falso-negativo* | Punteggio del rischio | Attenuazione minima del rischio richiesta ai controlli |
|--|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------|--|
| Diagnosi clinica su campione primario                      | 3                             | 3                              | 9                     | Buona garanzia   |
| Diagnosi clinica su campione secondario                    | 3                             | 2                              | 6                     | Buona garanzia   |
| Saggio di conferma (riferimento) del campione primario     | 3                             | 3                              | 9                     | Buona garanzia   |
| Saggio di conferma (riferimento) del campione secondario   | 3                             | 2                              | 6                     | Buona garanzia   |
| Trattamento critico di tipizzazione da campione primario   | 2                             | 2                              | 4                     | Garanzia accettabile                                   |
| Trattamento critico di tipizzazione da campione secondario | 2                             | 1                              | 2                     | Garanzia accettabile                                   |
| Tipizzazione per sorveglianza da campione primario         | 1                             | 1                              | 1                     | Garanzia ridotta                                       |
| Tipizzazione per sorveglianza da campione secondario       | 1                             | 1                              | 1                     | Garanzia ridotta                                       |

\* 1 – basso; 2 – moderato; 3 – elevato

## Conclusioni

La complessità e la diversità dei campioni e del rilevamento dei target con saggi diagnostici PCR comporta che un approccio standardizzato non è sempre possibile per una progettazione e implementazione dei controlli interni, ma che si possa considerare una possibile scala di affidabilità.

Le Piattaforme diagnostiche delle PCR real-time, oltre ai loro vantaggi operativi, offrono attualmente il mezzo più conveniente per l'implementazione dei saggi con i CI. I controlli interni sono di qualità superiore a quelli paralleli esterni.

Lo sviluppo e l'uso dei saggi in house deve chiaramente specificare la tipologia del campione clinico e il loro specifico utilizzo nel corso dell'assistenza clinica. Questa informazione deve essere utilizzata per determinare la garanzia richiesta dalla strategia di controllo.

I risultati della validazione del test in house devono contenere una chiara discussione della strategia di controllo e considerazioni sull'impatto di un risultato falso negativo.

## Appendice 2 – Progettazione di Parametri per Esperimenti di Validazione

| Parametro                                  | Progettazione   |
|--|---|
| Sensibilità analitica                      | Quattro serie di saggi diversi eseguiti con almeno tre replicati per diluizione del campione.   |
| Sensibilità diagnostica                    | Saggio su campioni (già analizzati con il test di riferimento o con appropriata alternativa) da casi con profilo clinico(i) definito. Il numero minimo di campioni da saggiare (per ottenere il livello richiesto di affidabilità della sensibilità) dipenderà dalla prevalenza della malattia e può essere calcolato dai minimi livelli di sensibilità al 95% CI presentato nella tabella I. |
| Specificità analitica                      | Saggio su DNA estratto da numerose varianti del microrganismo bersaglio, forme geneticamente correlate e microrganismi simili che possono essere riscontrati in casi positivi e negativi (>100) con profilo(i) clinico definito.  |
| Specificità diagnostica                    | Saggio su >50 campioni positivi e su >50 campioni negativi con il test di riferimento.  |
| Efficienza (analisi quantitative)          | Saggiare 10 diluizioni di un campione o controllo positivo in triplicato. Il campo di diluizione può fornire un C <sub>q</sub> s da <12 a >35 cicli.  |
| Linearità (analisi quantitative)           | Saggiare 10 diluizioni di un campione o controllo positivo in triplicato. L'intervallo di diluizione può fornire un C <sub>q</sub> s da <12 a >35 cicli.  |
| Intervallo di determinazione               | Saggiare 10 diluizioni di un campione o controllo positivo in triplicato. L'intervallo si estende dalla più bassa diluizione positiva alla diluizione dieci volte maggiore che fornisce un risultato positivo.  |
| Precisione (saggi quantitativi)            | Saggiare almeno tre campioni (positivo elevato, medio e basso) almeno quattro o più volte in una seduta analitica e in almeno quattro serie analitiche diverse in giorni diversi.   |
| Reproducibilità (saggi quantitativi)       | Saggiare tre campioni (positivo alto, medio e basso) almeno quattro o più volte in una seduta analitica e in almeno quattro serie analitiche diverse in giorni diversi. Queste possono essere eseguite in laboratori diversi o usando lotti diversi di reagenti o strumenti diversi.  |
| Accuratezza analitica (saggi quantitativi) | Saggiare tre standard analitici (positivo alto, medio, e basso) almeno quattro o più volte in una seduta analitica e in almeno quattro serie analitiche diverse in giorni diversi.  |
| Accuratezza clinica (saggi quantitativi)   | Saggiare tre standard analitici (positivo alto, medio, e basso) almeno quattro o più volte in una seduta analitica e in almeno quattro serie analitiche diverse in giorni diversi.  |
| Intervalli di riferimento                  | Saggiare >100 campioni (già analizzati con il test di riferimento) appartenenti a casi con profilo(i) clinico definito.   |
| Validazione clinica                        | Analisi di campioni da casi con profilo(i) clinico definito e con controlli successivi. Questa è una verifica nel tempo della prestazione del saggio.   |
| Periodo di validità                        | Campioni provenienti da tre lotti conservati a temperature definite. Le aliquote sono usate per saggiare i campioni (positivo alto, medio, e basso) almeno quattro o più volte in una seduta e in almeno due  |



Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da  
Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

|  |                          |
|--|--------------------------|
|  | serie in giorni diversi. |
|--|--------------------------|

## Appendice 3 - Metodi per Determinazione del Periodo di Validità

### Metodo 1

1. Prendere aliquote di campione sufficienti per l'intero studio e conservarle alla temperatura(e) richiesta.
2. Al tempo concordato (ad esempio, settimanale o mensile) eseguire prelievi dallo stoccaggio e saggiare lo stesso materiale di controllo utilizzato nel corso dello studio.
3. Continuare l'esperimento fino a raggiungere il termine convenuto o fino a quando il reagente inizia a perdere attività.
4. Tracciare il grafico dei risultati e assegnare il periodo di conservazione sulla base dei risultati ottenuti. Questo di solito è il tempo in cui il reagente osservato inizia a perdere un grado di attività minore rispetto a quello che introduce un margine di errore.

### Metodo 2

1. Prelevare aliquote di campioni sufficienti per lo studio e conservarli a temperatura molto bassa alla quale è noto che non si manifesta deterioramento (ad esempio, -80 C).
2. A intervalli concordati (ad esempio, settimanale o mensile) prendere alcuni campioni dalla conservazione a bassa temperatura e conservarli alla temperatura di conservazione proposta.
3. Continuare a mantenere i campioni alle temperature di conservazione fino alla scadenza del periodo di studio concordato.
4. Rimuovere tutti i campioni dalla condizione di conservazione e saggiarli simultaneamente.
5. Tracciare il grafico dei risultati e assegnare la durata di conservazione sulla base dei risultati ottenuti. Questo è di solito il tempo in cui il reagente inizia a manifestare una perdita di attività minore rispetto a quello che introduce un margine di errore.

### Vantaggi e svantaggi dei due metodi di determinazione del periodo di validità

|          | Vantaggi   | Svantaggi  |
|----------|--|--|
| Metodo 1 | <p>Se una prova fornisce risultati inattesi, non influenza gli altri e può essere poi considerata come un valore anomalo nell'ambito dei risultati della serie.</p> <p>Si possono conservare i campioni fino a quando il reagente inizia a perdere attività, ritenendo che il loro numero è sufficiente.</p> <p>Se per il saggio insorgono problemi in un secondo tempo, sono disponibili i risultati precedenti per dimostrare la sua validità.</p> | <p>Esecuzione del saggio ogni volta</p> <p>Richiesta la dimostrazione della stabilità dei controlli.</p> <p>Confronto possibile solo di ogni campione con il controllo e non con ciascun altro campione.</p> <p>Si potrebbe non essere in grado di usare gli stessi lotti di reagenti accessori che nel tempo potrebbero essere cambiati, introducendo un'altra variabile.</p> <p>Se si usano gli stessi lotti di reagenti di prodotti accessori, questi potrebbero modificarsi nel tempo, inserendo un'altra variabile.</p> |
| Metodo 2 | <p>Si esegue una sola serie analitica.</p> <p>Il saggio verifica tutti i campioni in modo simultaneo, rendendo possibile il confronto con un solo controllo e fra</p>  | <p>Se qualcosa non funziona nel corso del saggio, non è valido alcun risultato.</p> <p>Non disponendo di risultati noti sulle prestazioni del reagente, si potrebbe</p>  |

Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

|  |  |   |
|--|--|---|
|  | loro. L'utilizzo di un solo insieme di reagenti come tamponi, enzimi, sieri consente un miglior controllo della procedura. | conservare i campioni dopo che i reagenti prima utilizzati sono scaduti o decidere di saggiare tutti i campioni mentre hanno ancora un lungo periodo di validità. |
|--|--|---|

## Appendice 4 – Modulo per Procedura di Sviluppo Saggio

|  |  |
|--|--|
| Denominazione del saggio                         |  |
| Obiettivi specifici (patogeni e geni) del saggio |  |
| Responsabile progetto                            |  |
| Capo progetto                                    |  |
| Personale che esegue il lavoro di sviluppo       |  |

| Sezione                 | Sottosezione   | Collaboratore | Termine esecuzione | Completamento |
|-------------------------|--|---------------|--------------------|---------------|
| Programmazione & inizio | Responsabili progetto – valutazioni delle necessità              |               |                    |               |
|                         | Impostazione scopo e obiettivo del nuovo saggio                  |               |                    |               |
|                         | Firma della procedura  |               |                    |               |
|                         | Impostazione del registro dei rischi del progetto                |               |                    |               |
|                         | Questioni connesse a Salute e Sicurezza                          |               |                    |               |
|                         | Analisi economica  |               |                    |               |
|                         | Analisi commerciale  |               |                    |               |
|                         | Conformità alle normative  |               |                    |               |
|                         | Aspetti delle risorse umane                                      |               |                    |               |
|                         | Pianificazione del progetto e avvio                              |               |                    |               |
| Sviluppo del saggio     | Identificazione dei bersagli                                     |               |                    |               |
|                         | Impostazione parametri di riferimento e misura della prestazione |               |                    |               |
|                         | Valutazione opzioni tecnologiche                                 |               |                    |               |
|                         | Identificazione degli standard di riferimento                    |               |                    |               |
|                         | Identificazione del materiale di riferimento e reagenti          |               |                    |               |
|                         | <i>Simulazione al computer</i> del progetto                      |               |                    |               |
|                         | Progettazione tecnica  |               |                    |               |
|                         | Ottimizzazione   |               |                    |               |
|                         | Analisi della progettazione post-amplificazione                  |               |                    |               |
|                         | Sviluppo dei controlli   |               |                    |               |
|                         | Valutazione prestazioni analitiche                               |               |                    |               |
|                         | Preparazione di specifiche SOP (conformi al MIQE*)               |               |                    |               |

Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

| Sezione                           | Sottosezione  | Collaboratore | Termine esecuzione | Completamento |
|-----------------------------------|---|---------------|--------------------|---------------|
| Validazione                       | Progetto studio di validazione                      |               |                    |               |
|                                   | Valutazione della prestazione analitica             |               |                    |               |
|                                   | Scelta della popolazione in studio                  |               |                    |               |
|                                   | Scelta del tipo di campione                         |               |                    |               |
|                                   | Calcolo della dimensione del campione               |               |                    |               |
|                                   | Prestazioni della validazione clinica               |               |                    |               |
|                                   | Analisi dei risultati e interpretazione             |               |                    |               |
|                                   | Valutazione per l'utilizzo                          |               |                    |               |
|                                   | Studi di stabilità dei reagenti                     |               |                    |               |
|                                   | Ulteriore ottimizzazione se richiesta               |               |                    |               |
|                                   | Produzione di documentazione                        |               |                    |               |
| Immissione nel mercato e verifica | Revisione delle richieste degli utenti              |               |                    |               |
|                                   | Progettazione immissione sul mercato                |               |                    |               |
|                                   | Studi di verifica sul campo                         |               |                    |               |
|                                   | Previsione di pannelli di validazione               |               |                    |               |
|                                   | Confronti inter-laboratorio                         |               |                    |               |
| Implementazione                   | Implementazione nei flussi di lavoro in laboratorio |               |                    |               |
|                                   | Implementazione nei percorsi diagnostici            |               |                    |               |
|                                   | Implementazione nei percorsi clinici                |               |                    |               |
|                                   | Valutazione post-commercializzazione                |               |                    |               |
|                                   | Raccolta risultati a lungo termine                  |               |                    |               |
|                                   | Periodico CQ/AQ                                     |               |                    |               |
|                                   | Programma valutazione periodica                     |               |                    |               |
|                                   | Rilievo aspetti di implementazione                  |               |                    |               |
|                                   | Rivalutazione periodica di idoneità                 |               |                    |               |

•

## Appendice 5 – Relazione Riassuntiva per Validazione di Confezione o Reagente

(Aggiungere altre linee in tutte le caselle seguenti, se richieste)

|  |
|--|
| 1) Descrizione riassuntiva del saggio: |
|--|

| 2) Gruppo del progetto                         |      |             |  |
|--|------|-------------|--|
| Ruolo, es, statistico, tecnico di laboratorio. | Nome | Laboratorio | Area di attività, es, statistica, specialista molecolare, sierologia HIV |
| Direttore del Progetto                         |      |             |  |
| Capo Progetto                                  |      |             |  |
|  |      |             |  |
|  |      |             |  |

|   |
|---|
| 3) Scopo del saggio e generalità, accludendo le motivazioni per la realizzazione: |
|---|

|   |
|---|
| 4) Brevi informazioni sul piano di validazione: |
|---|

| 5) SOP (Standad Operating Procedures) di particolare interesse |        |
|--|--------|
| Numero   | Titolo |
|  |        |
|  |        |

| 6) COSHH (Control of Substances Hazardous to Health) rilevanti e altre valutazioni del rischio non elencate nelle SOP |        |
|---|--------|
| Numero  | Titolo |
|   |        |
|   |        |

| 7) Referenze crociate presenti anche in altri documenti correlati associati a questo studio (l'elenco può essere aggiunto e cancellato come appropriato) |           |           |            |                           |
|--|-----------|-----------|------------|---------------------------|
|  | SI        | NO        | N/D        | Posizione dei Documenti   |
| Confronti con metodo usato in precedenza o metodi di prova alternativi   |           |           |            |                           |
| Risultati AQE -Assicurazione Qualità Esterno (alcuni anni, se disponibile)   |           |           |            |                           |
| Risultati CQI Controllo Qualità Interno  |           |           |            |                           |
| Risultati AQI (Assicurazione Qualità Interna)  |           |           |            |                           |
| Registrazioni in house R&D (research and development)  |           |           |            |                           |
| Registri (specialmente riferiti a saggi in house)  |           |           |            |                           |
| <b>Resultati di prova:</b>   |           |           |            |                           |
| Positivi noti  |           |           |            |                           |
| Negativi noti  |           |           |            |                           |
| Positivi a basso titolo  |           |           |            |                           |
| Positivi ad alto titolo  |           |           |            |                           |
| Campioni impegnativi   |           |           |            |                           |
|  | <b>SI</b> | <b>NO</b> | <b>N/D</b> | <b>Sede dei Documenti</b> |

Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da  
Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

|  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|
| Il saggio è stato seguito valutato/revisionato per le seguenti caratteristiche:<br>i. Sensibilità<br>ii. Specificità<br>iii. Riproducibilità     |  |  |  |  |
| Documenti pubblicati e non pubblicati e relazioni, includendo valutazioni ufficiali  |  |  |  |  |
| Attività condotta in collaborazione con altri laboratori   |  |  |  |  |
| Risultati del saggio precedente  |  |  |  |  |
| Recensione verbali delle riunioni  |  |  |  |  |
| Istruzioni del produttore  |  |  |  |  |
| Caratteristiche tecniche del prodotto fornite dall'azienda   |  |  |  |  |
| Schede di sicurezza del prodotto   |  |  |  |  |
| Descrizioni del metodo e principali SOP per eseguire il saggio in corso di validazione   |  |  |  |  |
| Eventuali altre informazioni di supporto   |  |  |  |  |
| Il saggio è stato validato con la collaborazione di altri laboratori   |  |  |  |  |
| E' stato valutato il costo del saggio?   |  |  |  |  |
| Gli acquirenti sono stati informati dei cambiamenti significativi delle prestazioni del test: quali sensibilità, specificità e tempo di risposta |  |  |  |  |
| Il Manuale d'Uso è stato aggiornato  |  |  |  |  |

**8) Diario** (includere le date di tutti gli eventi importanti, quali incontri di revisione)

| Evento              | Data |
|---------------------|------|
| Inizio del progetto |      |
|                     |      |
|                     |      |

**9) Conclusioni** (includere un breve riassunto)

**Completare l'elenco delle richieste per la validazione prima di completare la successiva sezione di autorizzazione**

**SEZIONE PER L'AUTORIZZAZIONE DELLA VALIDAZIONE**

**Questo saggio è idoneo all'uso**

**Firma (Capo Progetto)**

**Data** \_\_\_\_\_

**Introduzione del saggio autorizzato**

**Firma (Responsabile del Progetto)**

**Data** \_\_\_\_\_

## Appendice 6 - Guida per Livello di Rivalidazione Considerata Accettabile Per una Serie di Modifiche al Protocollo

| Protocollo di modifica                     |              |   |                   |                        |                             |          |
|--|--------------|---|-------------------|------------------------|-----------------------------|----------|
| Attività di rivalidazione                  | primer/probe | reazioni componenti mix (ex – primer/probe) | metodo estrazione | materiale di controllo | Strumentazione e condizioni | analisi  |
| Sensibilità analitica                      | si           | si  | si                | no                     | si                          | si       |
| Sensibilità diagnostica                    | si           | *   | yes               | no                     | *                           | *        |
| Specificità analitica                      | si           | *   | limitata\$        | limitata               | limitata                    | limitata |
| Specificità diagnostica                    | si           | *   | *                 | no                     | *                           | *        |
| Efficienza (saggi quantitativi)            | si           | si  | no                | no                     | si                          | si       |
| Linearità (saggi quantitativi)             | si           | *   | si                | no                     | *                           | *        |
| Intervallo di misurazione                  | si           | *   | *                 | no                     | *                           | *        |
| Precisione saggi quantitativi              | si           | *   | si                | no                     | *                           | *        |
| Reproducibilità (saggi quantitativi)       | si           | *   | si                | no                     | *                           | *        |
| Accuratezza analitica (saggi quantitativi) | si           | *   | si                | si                     | *                           | *        |
| Accuratezza clinica (saggi quantitativi)   | si           | *   | si                | no                     | *                           | *        |
| Intervalli di riferimento                  | si           | *   | *                 | no                     | *                           | *        |
| Validazione clinica                        | si           | *   | *                 | no                     | *                           | *        |
| Periodo di conservazione                   | parziale&    | parziale                                    | no                | parziale               | no                          | no       |

\* Il livello di rinnovo della validazione richiesto dipenderà dal giudizio professionale nelle particolari circostanze di applicazione del saggio.

\$ Per il rinnovo della validazione limitato alla specificità analitica si prevede che sia sufficiente il saggio su un pannello ridotto di ceppi.



Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da  
Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

& Per il rinnovo parziale della validazione della durata di conservazione è prevista la ripetizione del saggio su un solo lotto

## Appendice 7 – Modulo del Piano del Progetto e Firma

---

Questo modulo deve essere completato e associato al Piano del Progetto

Titolo del progetto: *inserire il titolo del progetto*

Nomi e ruoli dei componenti del gruppo di revisione: *inserire qui l'elenco*

Il piano di progetto è stato revisionato ed è conforme alle linee guida per lo sviluppo e la validazione dei test diagnostici che dipendono dall'amplificazione e rilevamento dell'acido nucleico

Firma del Capo del gruppo di revisione: *inserire la firma e nome stampato*

### Modulo di Validazione con firma

Questo modulo deve essere completato e associato al Piano di Validazione

Titolo del progetto: *inserire il titolo del progetto*

Nomi e ruoli dei componenti il gruppo di revisione: *inserire l'elenco qui*

Il piano di validazione è stato rivisto ed è conforme alle linee guida per lo sviluppo e la validazione dei test diagnostici che dipendono dall'amplificazione e rilevamento dell'acido nucleico

Firma del Capo del gruppo di revisione: *inserire la firma e nome stampato*

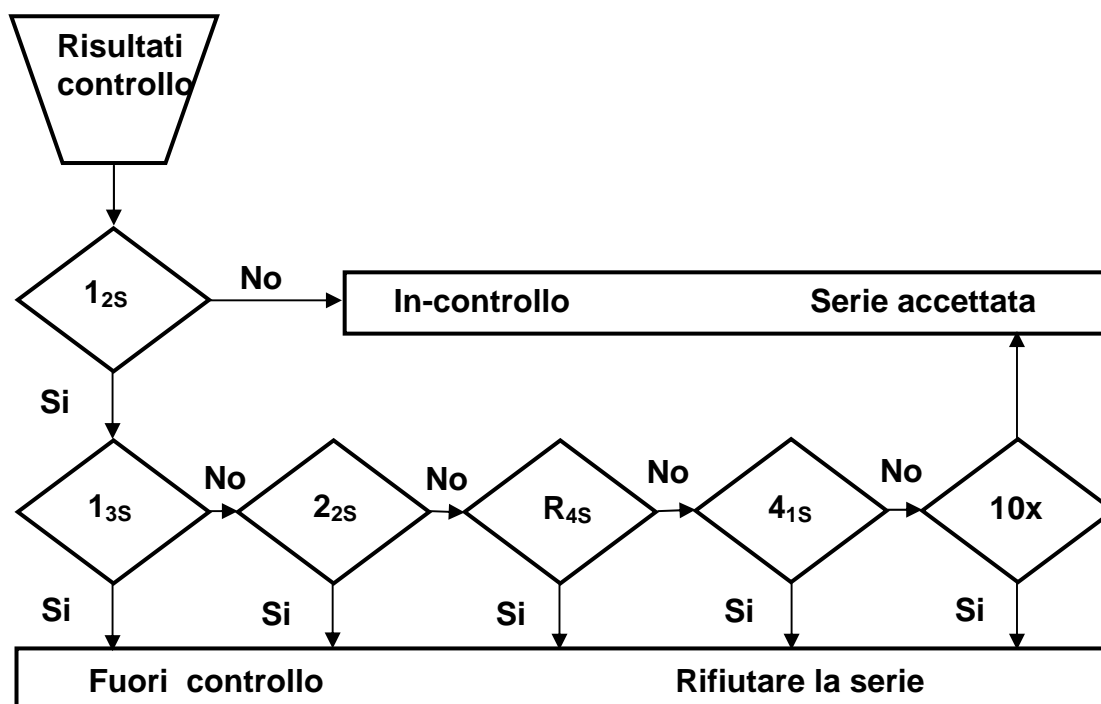
## Appendice 8 – Westgard

### Applicazione delle regole di Westgard per l'esecuzione del CQ per saggi diagnostici di amplificazione degli acidi nucleici

#### Introduzione

Le Regole di Westgard sono state definite per identificare e rifiutare le serie analitiche di routine in base ai risultati dei controlli positivi che falliscono in una o più serie di prove. I test sono selezionati per essere rigorosi nella loro capacità d'identificare scarse prestazioni pur avendo una ridotta percentuale di rifiuto ingiustificato. Per esempio, il test uno è riferito spesso al valore positivo che supera la media  $+ / - 3SD$  (regola  $1_{3S}$ ) e il due se due valori consecutivi nella stessa seduta superano la media  $+ / - 2SD$  (regola  $2_{2S}$ ). Una combinazione di queste regole, come illustrato nella figura, è un'alternativa ragionevole all'applicazione di una singola regola  $1_{2S}$  che comporterebbe una maggiore presenza di falsi scarti.

Figura. Utilizzo tipico delle regole di Westgard



Nel saggio PCR real time sono disponibili due tipi di controllo che possono essere usati come indicatori di qualità della serie, controlli positivi interno ed esterno (al lotto). L'uso potenziale del controllo interno (CI) per eseguire il CQ è suggestivo, ma richiede attenzione. I controlli interni sono stati progettati principalmente per permettere l'identificazione del rifiuto di test singoli. In funzione della sua progettazione, il CI può fornire un basso valore in un singolo saggio quando il bersaglio è presente a elevati livelli. In alternativa, in assenza di un segnale di prova intenso, un basso valore di CI può indicare che è presente nel campione un inibitore, oppure condizioni non ottimali di altri reagenti in una sola provetta. Anche se queste caratteristiche dei CI della PCR real-time sono problematici per l'applicazione e l'esecuzione del CQ, i CI possono tuttavia essere utili per il CQ della serie fornendo risultati che sono verificati secondo regole predeterminate volte a rimuovere i punti di riferimento in cui il CI fallisce a causa di fattori che non alterano l'intera serie analitica.

Un problema significativo delle regole di Westgard applicate ai risultati della PCR real time risiede nella necessità che i risultati dei controlli positivi abbiano una distribuzione normale. L'esame dei risultati ottenuti nella Divisione Servizi di Microbiologia per un certo numero di saggi con target diversi, indica che i raggruppamenti di superamento della soglia (SS) rispetto al numero di risultati all'interno di ciascun scomparto non sono normalmente distribuiti. La distribuzione è obliqua verso destra (diffonde cioè più sul lato del raggruppamento che

rappresenta valori di Cq elevati. Il risultato di questa inclinazione è che una applicazione standard delle regole Westgard che si avvalgono sulle deviazioni standard comporterà il rifiuto ingiustificato di serie di valori in cui i Cq sono elevati, ma che in realtà sono compresi nell'intervallo previsto (vale a dire, non rappresentano un problema per la serie analitica). Per evitare questo problema, si raccomanda che i valori di DS siano calcolati separatamente per punti sopra e sotto la media. Questa correzione è stata prospettata per garantire che le regole di Westgard siano ugualmente 'strette' sia sopra che sotto la media. Questa interpretazione non è stata progettata per creare la stessa probabilità di fallimento delle serie analitiche conseguente a entrambe le possibilità, anche perché la teoria dichiara che le reazioni invalidate forniscono con maggior probabilità alti valori di Cq.

### Regole per lo screening dei risultati del CI

Dove i risultati del CI sono da utilizzare per CQ è essenziale che siano filtrati per rimuovere i risultati influenzati da effetti competitivi o d'inibizione verificatisi, poiché questi sono dipendenti dal campione e non dalla qualità della serie analitica.

Per evitare il rifiuto di una serie analitica per elevati valori dei campioni positivi che superperforano rispetto ai loro CI, si consiglia che i campioni che forniscono risultati positivi inferiori a un ciclo di quantificazione predeterminata (Cq) siano eliminati dall'analisi del QC. Il livello varia in funzione della progettazione del saggio, ma lo si dovrebbe impostare ricorrendo a evidenze empiriche. Per esempio, la regola potrebbe essere che i singoli risultati del campione di CI sono scartati quando il campione Cq positivo raggiunge il livello necessario richiesto ad ottenere il risultato con una media d'incremento di due cicli nel Cq del  $CI_{[D2]}$ .

Per evitare l'annullamento della serie analitica prodotta dall'inibizione del campione, sono consigliati i seguenti passaggi. Poiché i CI sono normalmente inseriti alle concentrazioni limite del rilevamento, questi potrebbero non essere evidenziati (assenza di Cq) quando il campione contiene livelli di inibizione relativamente modesti. Quando il CI non fornisce risultato, dovrebbe essere scartato nel contesto della serie analitica del CQ. Per eliminare altre possibilità di ingiustificati rifiuti della serie, i risultati dei CI dovrebbero essere scartati quando i valori Cq sono superiori di tre cicli alla media. Questa regola elimina essenzialmente la possibilità di rifiuto dell'esecuzione della serie dovuta a valori elevati dei Cq di un solo CI in una singola prova.

### Selezione delle regole di Westgard

Le regole di Westgard dovrebbero essere applicate a tutti i controlli esterni e ai CI di screening, come descritto in precedenza. Le medie e le DS devono essere calcolate sulla base delle misure di controllo ottenute in condizioni di serie analitica normale (vale a dire una serie di validazione). Per i controlli positivi della PCR real time si ritiene possano rappresentare un minimo sufficiente una serie > 50 di valori Cq ottenuti in > 5 serie analitiche. Le determinazioni dei controlli da serie non validate non devono essere incluse (vale a dire quando si approntano serie per un nuovo saggio ognuna di loro deve prima essere esaminata nei confronti delle altre prima della sua inclusione). Quando si utilizza l'approccio del monitoraggio del QC descritto di seguito, il numero delle determinazioni di controllo eseguite non deve superare il 10% di quelle della serie di validazione.

### Esempio di un insieme accettabile di regole per QC della PCR real-time

Questo insieme di regole non può essere applicato a tutti i saggi. E' richiesto altro lavoro per determinare le regole generalmente applicabili per l'utilizzo dei risultati del controllo positivo della PCR real time. Come detto in precedenza, i valori di Cq per un controllo positivo della PCR real time non sono spesso normali nella loro distribuzione. Per ovviare a questo problema, si deve valutare e applicare in modo indipendente la DS per i Cq sopra e sotto la media.

La regola uno potrebbe essere la  $1_{3S}$  (cioè, quando rifiutare una determinazione del controllo in un gruppo che supera la media più 3s). L'applicazione di questa regola dovrebbe portare a una percentuale ridotta di falsi rifiuti di circa l'1% per serie analitiche che includono 2-4 controlli.

La regola due dovrebbe essere la  $2_{2S}$  (cioè due violazioni consecutive della regola  $1_{2S}$  in una singola serie).

La regola tre dovrebbe essere la  $R_{4S}$  (cioè rifiutare quando una determinazione di controllo di una serie analitica supera la media più 2s e un altro supera la media meno 2s).

## Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

La regola quattro dovrebbe essere la  $4_{1s}$  (cioè rifiutare quando quattro misurazioni consecutive dei controlli di una serie analitica sono superiori di  $1s$  o inferiori alla stessa media limite di controllo di  $1s$ ).

La regola cinque dovrebbe essere la  $N_x$  (cioè rifiutare quando  $N$  misurazioni di controllo consecutive cadono su un lato della media dove  $N$  è minore del numero delle misurazioni di controllo o di 8).

## Appendice 9 – Soluzione Problemi Diagnostici della PCR Real-Time

| Problema                    | Valutazione(i)Tecnica  | Azione(i) correttiva   | Implicazione(i) clinica |
|-----------------------------|--|--|-------------------------|
| Bassa sensibilità analitica | Scarsa solubilizzazione acido nucleico (es lisi)                                   | Modificare metodo estrazione   | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Acido nucleico idrolizzato   | Modificare metodo  | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Acido nucleico reticolato  | Modificare metodo usare amplicon più breve   | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Scarsa efficienza di estrazione  | Modificare metodo  | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Temperatura di annealing troppo elevata  | Ridurre temperatura  | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Tempo di annealing troppo breve  | Aumentare durata   | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Tempo di estensione troppo breve   | Aumentare durata   | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Tempo di denaturazione troppo breve  | Aumentare durata   | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Tempo di denaturazione troppo lungo  | Ridurre durata   | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Temperatura di denaturazione troppo elevata  | Ridurre temperatura  | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Scarsa purezza acido nucleico – inibitori PCR                                      | Modificare metodo estrazione   | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Scarsa purezza acido nucleico-macromolecole  | Modificare metodo estrazione   | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Temperatura denaturazione troppo bassa   | Aumentare temperatura  | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | dNTPs idrolizzato  | Sostituire dNTPs e controllare protocollo immagazzinamento                             | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Attività polimerasi troppo bassa   | Esaminare protocollo   | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Primer o probe contaminati, degradati o adsorbiti sul contenitore di conservazione | Sostituire il reagente ed esaminare protocollo di conservazione                        | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Primer legano bersaglio in modo insufficiente                                      | Riprogettare primer o condizioni della fase di annealing                               | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Concentrazione primer troppo bassa   | Aumentare concentrazione   | Falsi negativi          |
| Bassa sensibilità analitica | Struttura secondaria interna all'amplicone PCR                                     | Ridisegnare primer, modificare le condizioni di annealing o aumento concentrazione del | Falsi negativi          |

## Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

|   |   |   |  |
|---|---|---|--|
|   |   | primer  |  |
| Bassa sensibilità analitica                   | I primer formano dimeri o altri artefatti   | Ridisegnare i primer o modificare protocolli (es ridurre concentrazione primer o usare la partenza ad alta temperatura della reazione (hot-start) | Falsi negative o falsi positivi  |
| Bassa sensibilità o riproducibilità analitica | Ridotta accuratezza di pipettaggio  | Verificare strumentazione o rivedere protocollo (es. eliminate basso volume di pipettaggio)   | Falsi negativi o quantizzazione inaccurata inducono falsa diagnosi                   |
| Bassa sensibilità o riproducibilità analitica | Scarsa prestazione strumento per PCR real-time  | Controllo strumentazione  | Falsi negativi, falsi positivi o quantizzazione inaccurata inducono falsa diagnosi   |
| Bassa sensibilità o riproducibilità analitica | Scarsa prestazione strumento per estrazione   | Controllo strumentazione  | Falsi negativi, falsi positivi o quantificazione inaccurata inducono falsa diagnosi  |
| Bassa sensibilità o specificità analitica     | Scelta scarsa cicli parametri PCR   | Riprogettare parametri  | Falsi negativi o falsi positivi  |
| Bassa sensibilità o specificità analitica     | Scelta scarsa mix reazione PCR  | Riprogettare mix  | Falsi negativi o falsi positivi  |
| Bassa sensibilità o specificità analitica     | Attività polimerasi troppo elevata  | Redurre concentrazione polimerasi   | Falsi negativi o falsi positivi  |
| Bassa sensibilità o accuratezza quantitativa  | Sistema sonda produce scarso rapporto segnale/rumore  | Riprogettare sonde  | Falsi negativi o inaccurata quantificazione inducono errata diagnosi                 |
| Bassa riproducibilità analitica               | Polimerasi da fornitore con controllo di qualità irregolare (es. fornito di enzima con attività o concentrazione specifica variabile) | Cambiare fornitore  | Falsi negativi, falsi positivi o quantificazione inaccurata inducono errata diagnosi |
| Bassa riproducibilità analitica               | Scarsa messa a punto della strumentazione automatica per PCR  | Controllare strumentazione  | Falsi negativi, o quantizzazione inaccurata inducono errata diagnosi                 |
| Bassa riproducibilità analitica               | Scarsa riproducibilità pipettaggio  | Controllare strumentazione  | Falsi negativi, o quantificazione inaccurata inducono errata diagnosi                |

## Linea Guida per lo Sviluppo e la Validazione di Saggi Diagnostici che Dipendono da Amplificazione e Rilevazione di Acidi Nucleici

|  |  |                              |  |
|--|--|------------------------------|--|
| Bassa riproducibilità analitica              | Scarsa purezza acido nucleico - sali                         | Modificare metodo estrazione | Falsi negativi, falsi positivi o quantificazione inaccurata inducono errata diagnosi |
| Bassa specificità analitica                  | Temperature di annealing troppo bassa                        | Aumentare temperatura        | Falsi positivi   |
| Bassa specificità analitica                  | Tempo di annealing troppo lungo                              | Ridurre la durata            | Falsi positivi   |
| Bassa specificità analitica                  | Concentrazione primer troppo elevata                         | Ridurre concentrazione       | Falsi positivi   |
| Bassa specificità analitica                  | Strumento per estrazione causa contaminazione crociata       | Verifica strumentazione      | Falsi positivi   |
| Saggio non quantitativo                      | Bassa capacità estrazione matrice                            | Modificare metodo estrazione | Quantificazione inaccurata induce errata diagnosi                                    |
| Bassa sensibilità diagnostica                | I primer non riconoscono tutti i ceppi bersaglio previsti    | Riprogettare i primer        | Falso negativo   |
| Bassa sensibilità diagnostica                | Il probe(s) non riconoscono tutti i ceppi bersaglio previsti | Riprogettare il probe(s)     | Falso negativo   |
| Bassa sensibilità diagnostica                | I primer reagiscono con ceppi diversi da quello bersaglio    | Riprogettare i primers       | Falso positivo   |
| Bassa sensibilità diagnostica                | Il Probe(s) non corrisponde al ceppo bersaglio               | Riprogettare il probe(s)     | Falso positivo   |
| Controllo interno non funziona               | Problemi potenziali diversi                                  |                              | Nessun saggio fornito è interpretato secondo una SOP appropriata                     |
| Controllo positivo non funziona              | Problemi potenziali diversi                                  |                              | Nessun saggio fornito è interpretato secondo una SOP appropriata                     |
| Controllo negativo non funziona              | Contaminazione crociata                                      |                              | Nessuna serie analitica fornita è respinta   |
| Serie analitica fallisce CQ multi-funzionale | Problemi potenziali diversi                                  |                              | Nessuna esecuzione serie analitica fornita è interpretata secondo l'appropriata SOP  |



## Bibliografia

---

1. European Commission. Annex 15 to the EU Guide to Good Manufacturing Practice. 2001. p. 1-11.
2. Banoo S, Bell D, Bossuyt P, Herring A, Mabey D, Poole F, et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:S17-S29.
3. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Toward complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *Clin Chem* 2003;49:1-6.
4. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611-22.
5. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:550-76.
6. Patient-Centered Outcomes Research Institute. Draft Methodology Report: "Our Questions, Our Decisions: Standards for Patient-centered Outcomes Research". p. 1-206.
7. Patient-Centered Outcomes Research Institute. Standards in the Design, Conduct and Evaluation of Diagnostic Testing For Use in Patient Centered Outcomes Research. p. 1-59.
8. Stability testing of in vitro diagnostic reagents. British Standards Institution. 2002.
9. Application of risk management to medical devices. British Standards Institution. 2009.
10. Molecular diagnostic methods for infectious diseases; approved guidelines, 2nd edition. CLSI MM3-A2 ed. 2006.
11. Lange M, Neubauer H, Seyboldt C. Development and validation of a multiplex real-time PCR for detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. *Mol Cell Probes* 2010;24:204-10.
12. Picard FJ, Gagnon M, Bernier MR, Parham NJ, Bastien M, Boissinot M, et al. Internal control for nucleic acid testing based on the use of purified *Bacillus atrophaeus* subsp. *globigii* spores. *J Clin Microbiol* 2009;47:751-7.
13. Brightwell G, Pearce M, Leslie D. Development of internal controls for PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Mol Cell Probes* 1998;12:367-77.
14. Pugnale P, Latorre P, Rossi C, Crovatto K, Paziienza V, Gottardi AD, et al. Real-time multiplex PCR assay to quantify hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol Methods* 2006;133:195-204.