

Risultati qualitativi e quantitativi del programma di Valutazione Esterna di Qualità VEQ SARS-CoV-2 RNA condotto in Regione Lombardia nel 2021

Laura Pellegrinelli¹, Fabio Pasotti², Giuseppa Liga², Cristina Galli¹, Manuela Rizzetto², Simona Da Molin², Giovanna Azzarrà², Oana Livia Lungu², Silvia Greco², Sandro Binda¹, Danilo Cereda³, Matteo Corradin³, Elena Pariani¹, Sabrina Buoro^{2,3}

¹Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano, Milano

²Centro Regionale di Coordinamento della Medicina di Laboratorio di Regione Lombardia, Milano

³Direzione Generale Welfare Regione Lombardia, Milano

Questo lavoro è stato in parte presentato al 54° Congresso Nazionale SIBioC - Genova, 5-7 ottobre 2022, nella sessione Young Scientists

ABSTRACT

Qualitative and quantitative performance of SARS-CoV-2 nucleic acid detection tests: results from the 2021 External Quality Assessment in Lombardy

Introduction: to evaluate the qualitative test performance and inter-assay variations of SARS-CoV-2 nucleic acid detection tests by analysing the results of the External Quality Assessment (EQA) programme carried out in Lombardy in 2021.

Methods: the 2021 EQA for SARS-CoV-2 molecular test programme consisted on testing of 12 exercise (12 samples of cells culture supernatants): 5 were SARS-CoV-2-negative and 7 SARS-CoV-2-positive samples [3 had viral load (VL) $>5 \times 10^3$ copies/mL, 4 VL = $1-5 \times 10^3$ copies/mL]. Participating laboratories provided qualitative (positive/negative) and quantitative (Cycle threshold, Ct value) results for each molecular test in use. Qualitative test performance was evaluated by positive/negative percent agreement (PPA/NPA); inter-assay variation of quantitative results was evaluated by coefficient of variation (CV).

Results: 79 to 90 laboratories participated by using 199 to 231 systems, returning 2 623 qualitative/quantitative results. PPA ranged between 99.5% and 100%, NPA between 69.9% and 100%. NPA range was 99.1-100% by ruling out the "invalid" results (n=89). CV ranged between 11.6% and 13.5% (samples with VL = $1-5 \times 10^3$ copies/mL) and between 10.8% and 14.2% (samples with high VL). The two most used systems gave the following results. System A (275 results) and B (245 results): CV by viral target ranged between 2.4-3.8% and 6.4-9% (samples with VL = $1-5 \times 10^3$ copies/mL) and between 2.8-4.2% and 7.3-11.9% (samples with high VL) respectively.

Discussion: within 2021 EQA for SARS-CoV-2 molecular test, PPA and NPA were above 99.1%. However, the inter-assay variability among systems was notable and related both to viral load and to viral target detected by the test. This variability, thought limited, needs to be carefully evaluated and continuously monitored within quality assurance programs.

Parole chiave: Verifica Esterna di Qualità, SARS-CoV-2, diagnostica molecolare

INTRODUZIONE

Alla fine del 2019 è stato identificato per la prima volta nell'uomo un nuovo ceppo di coronavirus denominato SARS-CoV-2 (1), responsabile di una grave sindrome respiratoria acuta denominata COVID-19. In pochi mesi il virus si è diffuso in tutta la popolazione mondiale provocando una pandemia (1,2). Tutti i Paesi nel mondo dall'inizio della pandemia da SARS-CoV-2 hanno concentrato i propri sforzi per controllare e rallentare la

diffusione della malattia, per prevenirne il contagio e per individuare la terapia per i pazienti che ne erano affetti. Uno dei nodi cruciali di questi sforzi è stato quello di mettere a punto sistemi diagnostici in grado di distinguere individui con infezione da individui non infetti. Il gold standard per la diagnosi di infezione da SARS-CoV-2 rimane ad oggi l'approccio molecolare con rRT-PCR (real-time reverse transcription polymerase chain reaction) (3,4), nonostante nel tempo siano stati sviluppate altre tipologie di test quali i metodi antigenici e sierologici (5-7).

Corrispondenza a: Laura Pellegrinelli, Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano, E-mail: laura.pellegrinelli@unimi.it

Ricevuto: 30.03.2023

Revisionato: 17.04.2023

Accettato: 28.05.2023

Publicato on-line: 30.06.2023

DOI: 10.19186/BC_2023.042

L'urgenza di ridurre gli effetti devastanti della pandemia ha determinato da parte dell'industria diagnostica un incredibile e rapidissimo sviluppo di sistemi di diagnostica molecolare rRT-PCR (8). Per monitorare la qualità dei risultati prodotti da questi nuovi sistemi sono stati utilizzati programmi di Verifica Esterna di Qualità (VEQ), che permettono una verifica di terza parte indipendente (9,10). La Regione Lombardia attraverso i programmi VEQ, gestiti ed erogati dal Centro Regionale di Coordinamento della Medicina di Laboratorio (CRC MedLab), monitora la qualità delle prestazioni dei laboratori clinici del territorio (11). Il CRC MedLab dal 2020 ha implementato tre distinti programmi VEQ per la diagnostica di SARS-CoV-2: diagnostica molecolare (RNA SARS-CoV-2), antigenica (Antigene SARS-CoV-2) e sierologica (Sierologia SARS-CoV-2) (12).

Scopo del presente articolo è riportare le prestazioni analitiche e la variabilità inter-saggio dei metodi in uso nei laboratori clinici di Regione Lombardia che hanno partecipato al programma VEQ RNA SARS-CoV-2 nell'anno 2021.

METODI

Modalità di partecipazione al programma

In Italia, la partecipazione ad un programma di VEQ è un requisito per l'accreditamento (13) ed in Regione Lombardia è stata recepita ed applicata con la DGR n° VII/3313/2001 (14) che ha confermato l'obbligatorietà della partecipazione a programmi VEQ per tutte le prestazioni eseguite in sede.

Prima di poter aderire al programma VEQ RNA SARS-CoV-2 e poter far parte della rete regionale per la diagnostica molecolare COVID-19, tutti i sistemi utilizzati dai laboratori clinici di Regione Lombardia sono stati sottoposti a preventiva verifica dei valori di concordanza con il metodo di riferimento (15,16) condotta presso il laboratorio di riferimento regionale per la sorveglianza virologica dell'influenza e di COVID-19 del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano (17). In seguito al buon esito della verifica, il laboratorio entra a far parte della rete regionale ed è obbligato a partecipare al programma. Nessuno dei laboratori partecipanti ha dichiarato la contrarietà all'uso da parte del Centro dei risultati dell'anno 2021 del programma VEQ SARS-CoV-2 RNA, in forma anonimizzata ed aggregata, a scopo scientifico per studi e ricerche finalizzate alla tutela della collettività in campo medico, biomedico ed epidemiologico.

Organizzazione del programma 2021 e preparazione del materiale di controllo

Il programma VEQ SARS-CoV-2 RNA 2021 prevedeva 12 esercizi condotti con cadenza mensile durante tutto il 2021.

Il materiale di controllo utilizzato per lo svolgimento degli esercizi VEQ è stato acquisito dal CRC MedLab presso Polymed s.r.l (Barberino Tavarnelle, Firenze) il quale indica il risultato atteso dall'analisi del materiale

come: negativo o positivo per SARS-CoV-2. In questo secondo caso inoltre indica se: il campione è positivo ad alta concentrazione virale (viral load, VL) $>5 \times 10^3$ copie/mL) o è positivo a bassa concentrazione virale (VL $1-5 \times 10^3$ copie/mL). Il materiale di controllo utilizzato era costituito da 1 mL di surnatante ottenuto da colture cellulari coltivate dopo inoculo di tamponi nasofaringei risultati positivi o negativi. Le colture cellulari derivano da cellule epiteliali umane di tumore polmonare (A549 (ATCC® CCL185™)).

Ogni laboratorio partecipante alla VEQ ha ricevuto in una provetta il materiale di controllo costituito dal volume di surnatante preventivamente inattivato e liofilizzato ed il corrispondente flacone contenente una soluzione tampone con la quale risospendere il campione dell'esercizio prima di procedere alla determinazione.

Il programma era costituito da 5 campioni SARS-CoV-2 negativi (esercizi numero 2, 4, 8, 9, 12) e da 7 campioni SARS-CoV-2 positivi; di questi ultimi, 3 erano campioni SARS-CoV-2 positivi ad alta concentrazione (VL $>5 \times 10^3$ copie/mL; esercizi 1, 5, 10), e 4 erano campioni SARS-CoV-2 positivi a bassa concentrazione (VL $1-5 \times 10^3$ copie/mL; esercizi 3, 6, 7, 11) (Tabella 1).

Il materiale dei 12 esercizi è stato inviato ai laboratori partecipanti a temperatura controllata (+2/+8°C) e consegnato entro 3 giorni dalla data di spedizione; una volta giunto in laboratorio il materiale di controllo doveva essere conservato a +2/+8°C sino all'analisi. Inoltre, ogni laboratorio doveva dare conferma di avvenuta ricezione del materiale, indicando se questo fosse stato ricevuto in condizioni idonee all'analisi (tra queste, materiale non danneggiato, a temperatura controllata, con volume sufficiente) mediante la compilazione di un modulo online predisposto sul sito web del CRC MedLab.

Validazione dal materiale di controllo

Per validare preliminarmente l'omogeneità dei campioni degli esercizi all'interno del programma, 10 aliquote del medesimo lotto di un esercizio rappresentato da un campione SARS-CoV-2 positivo sono state testate in doppio con test rRT-PCR (18) dal laboratorio del centro di riferimento regionale per la sorveglianza virologica dell'influenza e di COVID-19 del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli studi di Milano.

Per quanto riguarda la stabilità dei campioni in esame, si è confermato quanto dichiarato dal produttore del materiale di controllo per cui il materiale è stabile nella confezione integra sino alla data di scadenza riportata sull'etichetta a +2/+8°C, e per 72 ore dopo ricostituzione, conservando il flacone chiuso a +2/+8°C.

Raccolta dati ed elaborazione

All'interno del programma è stato richiesto l'invio dei risultati delle analisi effettuate entro una scadenza resa nota (in media 10 giorni lavorativi dopo la ricezione del materiale) sul sito web del CRC MedLab. Nel dettaglio, ogni laboratorio partecipante, per ogni esercizio doveva inserire sul sito web le informazioni relative a:

- sistema diagnostico utilizzato, ovvero combinazione del metodo di estrazione degli acidi nucleici (Nome Azienda/Kit) e del metodo di amplificazione (Nome Azienda/Kit) dell'RNA di SARS-CoV-2, specificando il (o i) target genico (o i) virale (o i);
- risultato analitico qualitativo ottenuto tra i seguenti: Positivo/Debole Positivo/Negativo/Dubbio/Invalido;
- risultato analitico quantitativo, espresso come valore di ciclo soglia (Cycle threshold, Ct) per ogni target virale ricercato.

Entro 7 giorni lavorativi dalla scadenza dell'invio dei risultati dell'analisi di ciascun esercizio, è stato pubblicato un elaborato dei risultati. Nel rapporto di elaborazione è stato riportato il numero e la percentuale dei laboratori partecipanti all'esercizio, dei sistemi utilizzati e dei test effettuati. Sono state inoltre indicate le informazioni inerenti a: risultato qualitativo ottenuto e indicazione del target genico di SARS-CoV-2 (Rilevato/non Rilevato); in caso di rilevazione del target virale sono stati riportati i valori mediani tra i valori di Ct inseriti, e il valore minimo e massimo di Ct.

Analisi statistica

Per la valutazione analitica della concordanza dei risultati qualitativi ottenuti dai laboratori per ciascun esercizio all'interno del programma "VEQ RNA SARS-CoV-2" 2021, sono stati calcolati:

- percentuale di concordanza positiva (positive percent agreement, PPA);
- percentuale di concordanza negativa (negative percent agreement, NPA);
- media, deviazione standard (DS) e coefficiente di variazione (CV%) dei valori di Ct ottenuti per misurare l'imprecisione fra metodi;

Sono stati esclusi dall'analisi i sistemi con ≤ 3 utilizzatori.

L'analisi statistica per interpretare i risultati ottenuti dai test di omogeneità è stata condotta in accordo alla norma UNI EN ISO 13528, Annex B (18), calcolando e confrontando il CV% storico del programma VEQ RNA SARS-CoV-2.

Per le analisi statistiche, è stato utilizzato il software Bioedit (19) e l'applicativo Excel (Microsoft Office).

RISULTATI

Test di omogeneità

Il test per valutare l'omogeneità dei lotti ha confermato che i campioni utilizzati nel programma erano omogenei avendo mostrato una media (DS) di 26,84 (0,08152), inferiore al valore soglia di 1,37, determinato dal calcolo $0,3 \times \text{spt}$. Il spt è calcolato dalla media dei risultati ottenuti moltiplicata per il CV storico del programma VEQ (17,01) diviso 100 (18). Il CV% storico è stato calcolato sugli esercizi con esito qualitativo "positivo" degli anni 2020, 2021 e 2022 rispettivamente per gli esercizi 4, 7 e 3.

Risposte ottenute

Il numero di laboratori e di sistemi utilizzati che hanno partecipato alla "VEQ RNA SARS-CoV-2" 2021 è mostrato nella Figura 1. Il numero di laboratori autorizzati allo svolgimento di indagini molecolari per la diagnosi di SARS-CoV-2 in Lombardia è cresciuto nel corso del 2021, passando da 79 laboratori che hanno partecipato all'esercizio 1 a 90 laboratori per l'esercizio 12 (Figura 1), con un incremento percentuale del 14%.

I sistemi per identificare il genoma di SARS-CoV-2 utilizzati dai laboratori all'interno della VEQ erano rappresentati da diverse combinazioni tra kit e strumenti di estrazione degli acidi nucleici e kit e strumenti di amplificazione del genoma di SARS-CoV-2. Nel dettaglio, sono stati utilizzati 70 diversi kit di estrazione combinati a 54 strumenti di estrazione degli acidi nucleici e 61 diversi saggi di rRT-PCR per identificare il genoma di SARS-CoV-2 mediante 35 strumenti di PCR. In totale, i saggi molecolari per identificare SARS-CoV-2 erano rivolti verso diversi target del genoma virale ed in particolare verso i geni codificanti per il nucleocapside (N), per l'envelope (E), per Spike (S), per l'RNA-polimerasi RNA-dipendente (RdRp) e per gli Open Reading Frame (ORF) 1 e 8.

Il numero dei sistemi utilizzati è passato da 199 per l'esercizio 1 a 231 per l'esercizio 12 (Figura 1), con un incremento percentuale pari al 16%.

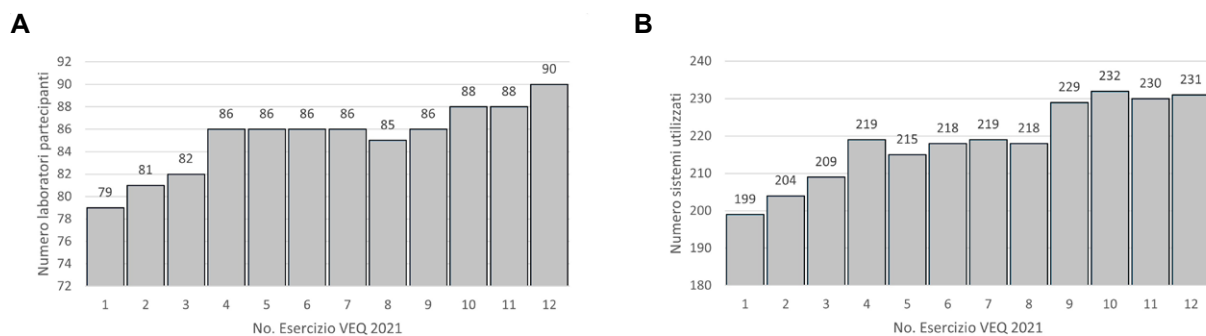


Figura 1

Numero di laboratori partecipanti (pannello A) e numero dei sistemi utilizzati (pannello B) per ogni esercizio all'interno del programma VEQ RNA SARS-CoV-2 2021.

Complessivamente, durante l'esercizio, sono stati ottenuti 2 737 risultati: 2 623 di questi risultati (95,8% del totale) riportavano anche un risultato quantitativo e cioè il valore di Ct del target genico amplificato.

In totale, il 5,6% (13/231) dei sistemi erano rappresentati da saggi molecolari definiti chiusi, cioè dove l'intervento dell'operatore riguardava solo il caricamento del campione biologico nello strumento analitico in cui la fase di estrazione degli acidi nucleici e l'amplificazione del genoma di SARS-CoV-2 avvenivano senza ulteriore intervento dell'operatore.

I target genici di SARS-CoV-2 analizzati con maggior frequenza sono stati il gene N ed E; in dettaglio, il 31% (n=849) dei risultati era ottenuto mediante reazioni volte alla rilevazione del gene N, il 23,1% (n=633) del gene E, il 18,2% (n=497) di RdRp, il 10,2% (n=277) di ORF-1, il 9,8% (n=269) di ORF-8, il 7,7% (n=212) del gene S.

Percentuale di concordanza positiva, percentuale di concordanza negativa, coefficiente di variazione dei valori di Ct ottenuti

Il valore di PPA ottenuto per gli esercizi costituiti da campioni SARS-CoV-2 positivi è oscillato tra 99,5% (esercizi 1 e 7) e 100% (esercizi 5 e 6); il valore di NPA ottenuto per gli esercizi costituiti da campioni SARS-CoV-2 negativi è oscillato tra il 69,9% (esercizio 4) ed il 100% (esercizi 8 e 9). Analizzando in dettaglio i dati relativi agli esercizi costituiti da campioni SARS-CoV-2

negativi, si è osservato che i bassi valori di NPA erano causati dalla presenza di una rilevante quota di risultati riportati come invalidi (n=89) in particolare per l'esercizio 4 (29,2%) e 12 (10,4%). Escludendo dalla valutazione dei valori di NPA i risultati considerati invalidi, l'intervallo di valori oscillava tra 99,1% (esercizio 4) ed il 100% (esercizi 8 e 9). Il risultato invalido fornito da alcuni sistemi derivava dall'assenza di amplificazione del controllo interno cellulare dei campioni dell'esercizio in esame: il fornitore del materiale aveva indicato come possibile spiegazione che la sospensione di coltura cellulare con cui era stato allestito il campione utilizzato per gli esercizi 4 e 12 fosse troppo diluita.

Considerando tutti i risultati qualitativi forniti indipendentemente dal/i sistema/i utilizzato/i, i valori di media, DS e CV% per esercizio sono riportati nella Tabella 1; la dispersione dei valori di Ct per esercizio è riportata nella Figura 2.

Complessivamente i valori di CV per gli esercizi rappresentati da campioni SARS-CoV-2 positivi ad alta concentrazione virale sono oscillati tra 10,8% e 14,2% mentre i valori di CV per gli esercizi rappresentati da campioni SARS-CoV-2 positivi a bassa concentrazione virale sono oscillati tra 11,6% e 13,5% (Figura 2).

Per quanto riguarda i sistemi chiusi, i valori di CV ottenuti analizzando gli esercizi rappresentati da campioni SARS-CoV-2 positivi a bassa concentrazione virale oscillavano tra 10,7% e 13,7% e per gli esercizi rappresentati da campioni SARS-CoV-2 positivi ad alta

Tabella 1

Descrizione degli esercizi in esame [risultato qualitativo atteso, intervallo di concentrazione (copie/mL) e risultati quantitativi totali (valore di Ct medio) e Coefficiente di Variazione (CV) totale fra metodi (N=2623 risultati) e per i singoli sistemi presi in esame (A1/A2, N= 275 e B1/B2, N= 245)]

	Esercizio VEQ RNA SARS-CoV-2 2021											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Risultato qualitativo atteso	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg
Intervallo concentrazione (copie/mL)	>5×10 ³		1-5×10 ³		>5×10 ³	1-5×10 ³	1-5×10 ³			>5×10 ³	1-5×10 ³	
Valore Ct media (DS)	22 (2,6)		24,9 (3,1)		21,7 (2,3)	21,5 (2,5)	22,1 (2,7)			22,4 (3,2)	25,9 (3,5)	
CV fra metodi	"SISTEMA A", Target virale A1	11,9%		7,8%		7,3%	6,4%	8,7%		9,3%	9%	
	"SISTEMA A", Target virale A2	10,4%		6,6%		5,8%	6,6%	7,7%		7,6%	7,8%	
	"SISTEMA B", Target virale B1	4,1%		2,5%		2,1%	2,7%	4,1%		4,4%	4,3%	
	"SISTEMA B", Target virale B2	4,2%		2,4%		2,8%	2,6%	3,8%		4,1%	3,8%	
	Totale	11,8%		12,4%		10,8%	11,6%	12,2%			14,2%	13,5%

Pos, positivo; Neg, negativo.

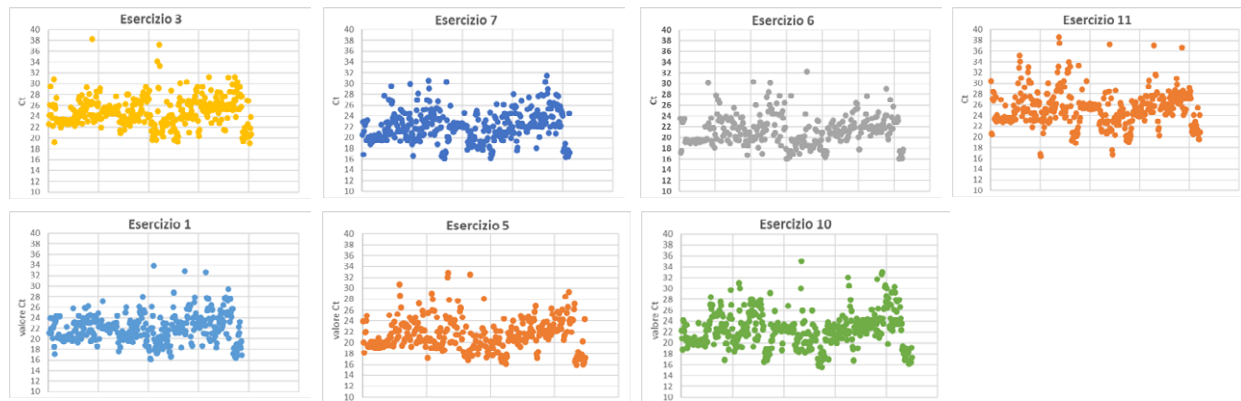


Figura 2

Distribuzione della dispersione dei valori di Ct degli esercizi costituiti da campioni SARS-CoV-2 positivi ad alta concentrazione virale ($VL >5 \times 10^3$ copie/mL; esercizi 1, 5, 10) e a bassa concentrazione ($VL 1-5 \times 10^3$ copie/mL; esercizi 3, 6, 7, 11) Ct, Cycle threshold; VL, viral load.

concentrazione virale tra 9,6% e 13%.

Sono stati analizzati i risultati quantitativi per gli esercizi rappresentati da campioni SARS-CoV-2 positivi forniti dai due sistemi maggiormente (19%) utilizzati dai laboratori. In totale il 10,5% (275/2 623) dei risultati quantitativi sono stati forniti da un sistema denominato sistema A in grado di rilevare due target virali A1 e A2 e il 9,3% (245/2 623) sono stati forniti da un sistema denominato sistema B che rilevava i target virali B1 e B2.

Prendendo in considerazione gli esercizi rappresentati da campioni SARS-CoV-2 positivi a bassa concentrazione virale i valori di CV calcolati per esercizio e per gene target oscillavano tra il 2,4 e il 3,8% (B2) e il 6,4 e il 9% (A1) e considerando gli esercizi rappresentati da campioni SARS-CoV-2 positivi ad alta concentrazione virale i valori di CV calcolati per esercizio e per gene target oscillavano tra il 2,1 e il 4,4% (B1) e tra il 7,3 e il 11,9% (A1) (Tabella1).

DISCUSSIONE

L'emergenza di SARS-CoV-2 e la conseguente pandemia dichiarata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) a marzo 2020 ha portato sfide imprevedibili e senza precedenti per la sanità pubblica globale (1,2). L'urgenza di contrastare la diffusione della pandemia ha determinato da parte dell'industria diagnostica un incredibile e rapidissimo sviluppo di sistemi di diagnostica molecolare (in particolare di saggi di rRT-PCR, riconosciuti come test diagnostici di riferimento) per rispondere alla sempre crescente richiesta di riconoscere la presenza dell'infezione sia nel soggetto asintomatico sia nel paziente con COVID-19 (3,4). Per monitorare la qualità dei risultati prodotti da questi saggi molecolari che sono stati largamente utilizzati a laboratori clinici del territorio per contrastare la pandemia, la Regione Lombardia ha implementato programmi di VEQ *ad hoc*, gestiti ed erogati dal CRC MedLab (9). Il programma "VEQ RNA SARS-CoV-2" è stato uno strumento indiretto per la verifica della qualità delle prestazioni dei laboratori clinici rese agli utenti finali. Tale programma, costituito da 12 esercizi condotti mensilmente è stato svolto da un numero di laboratori autorizzati e di sistemi utilizzati che ha avuto

un incremento del 14% e del 16%, rispettivamente, durante l'anno 2021, tanto che 90 laboratori hanno partecipato alla conduzione dell'ultimo esercizio del 2021 utilizzando 231 diversi sistemi diagnostici.

La numerosità dei sistemi diagnostici molecolari e l'eterogeneità dei target del genoma di SARS-CoV-2 identificati rappresentano elementi da considerare nella valutazione della variabilità dei risultati intra- e inter-laboratorio e ancora di più nel confronto dei risultati (20,21). Questo appare rilevante se si considera che i saggi molecolari possono fornire - oltre al risultato qualitativo (presenza/assenza del target genico) - risultati quantitativi o semi-quantitativi quali il valore di Ct per target genico amplificato, considerato "proxy" della concentrazione di SARS-CoV-2 nel campione in esame e della trasmissibilità dell'infezione (4). Il valore di Ct è inversamente proporzionale alla concentrazione di gene target nel campione e può essere influenzato da diverse variabili, inclusa la qualità del campione, la qualità del metodo di estrazione degli acidi nucleici e la scelta dei primers (8). Ad oggi, i target virali N, E, S, ORF e RdRp sono stati quelli maggiormente impiegati per la diagnostica molecolare di SARS-CoV-2 (8,22,23) e l'OMS ha pubblicato diversi protocolli di saggi RT-PCR che considerano target genici di SARS-CoV-2 differenti (8) cosicché può risultare difficile il confronto dei valori di Ct.

Durante il programma di VEQ, quasi tutte le risposte (95,8%) ottenute dai laboratori riportavano anche il valore di Ct, che nel 31% dei casi si riferiva all'amplificazione del gene N e nel 23,1% del gene E, che quindi sono risultati i due target virali maggiormente utilizzati, analogamente a quanto osservato in altri Paesi (10,15,16,24). Infatti, è stato dimostrato che i metodi molecolari volti alla identificazione e quantificazione dei target N, E, e RdRP sono maggiormente sensibili e clinicamente accurati e quindi maggiormente utilizzati dai laboratori di tutto il mondo (10,15,16).

Durante il programma, i valori di PPA e NPA ottenuti tra i laboratori autorizzati sono stati soddisfacenti. In effetti, il valore di PPA è oscillato tra il 99,5% e il 100% e il valore di NPA tra il 69,9% e il 100%. Analizzando in dettaglio i risultati degli esercizi in cui è stato ottenuto il

minor valore di NPA, è stato osservato che per questi campioni, una rilevante (29,2%) quota di laboratori aveva riportato quale invalido il risultato ottenuto a causa della qualità non ottimale del campione in esame, probabilmente causata da un'eccessiva diluizione della sospensione di coltura cellulare con conseguente fallimento della rilevazione del materiale umano come controllo di avvenuta reazione. Ciò sottolinea che tra le sorgenti di errore nella diagnostica COVID-19, la fase pre-analitica (dipendente dalla qualità del campione stesso, dalla conservazione/trasporto e dal trattamento pre-analitico del campione) influenza significativamente il risultato atteso (25). Altre sorgenti di errore possono essere individuate nella fase analitica, in particolar modo durante l'estrazione e l'amplificazione degli acidi nucleici, e possono essere contenute mediante l'implementazione della automazione e di sistemi analitici chiusi (25), che hanno rappresentato il 5,6% dei sistemi utilizzati nel programma qui analizzato.

È stato misurato il valore di imprecisione fra i diversi metodi mediante il calcolo CV% dei valori di Ct. Sostanzialmente si è osservata una tendenza ad una minor variabilità tra tutti i risultati quantitativi laddove il campione avesse una concentrazione virale maggiore, come osservato anche in un altro studio (26); infatti i valori di CV% per gli esercizi rappresentati da campioni SARS-CoV-2 positivi ad alta concentrazione virale sono oscillati tra 10,8% e 14,2% ed i valori di CV% per gli esercizi rappresentati da campioni SARS-CoV-2 positivi a bassa concentrazione virale sono oscillati tra 11,6% e 13,5%. Questi valori di imprecisione sono risultati inferiori a quelli osservati in studi in cui i valori di CV% oscillavano tra il 12,8% e il 23% (27,28). Quindi, il CV% medio è risultato pari a 12,4%; su una scala di risultati quantitativi espressi in Ct che va da 0 a 42, tale variazione rappresenta differenze di risultato logaritmiche nell'ordine di +/- 5 Ct: questo dato sembra molto importante soprattutto per risultati vicini al valore decisionale di positività.

È interessante notare come l'imprecisione della misura del valore di Ct diminuisca analizzando i dati prodotti dai due sistemi maggiormente utilizzati dai laboratori autorizzati in Regione Lombardia e analizzando gli stessi geni virali target; infatti, considerando gli esercizi rappresentati da campioni SARS-CoV-2 positivi a bassa concentrazione virale, i valori di CV oscillavano tra 2,4% e 3,8% e 6,4% e 9% e per gli esercizi alta concentrazione virale tra 2,1% e 4,4% e 7,3% e 11,9%. Il confronto dei CV% totali con quelli dei due sistemi maggiormente considerati suggerisce che la precisione nel quantificare il genoma di SARS-CoV-2 aumenterebbe utilizzando saggi quantitativi di rRT-PCR standardizzati; ciononostante, rimane ancora controverso il correlare il valore di carica virale con l'infettività e la durata della clearance virale, soprattutto in mancanza di precisi modelli statistici. In ultimo, i dati di dispersione dei valori di Ct, potrebbero suggerire l'utilità per il paziente in follow-up di eseguire l'analisi sempre nel medesimo laboratorio.

Il principale punto di forza di questo studio è che ha permesso di analizzare statisticamente la distribuzione dei valori di Ct di oltre 2600 test molecolari ottenuti attraverso la conduzione di esercizi VEQ su campioni

omogenei e stabili, quindi con controllata variabilità pre-analitica. La valutazione delle prestazioni analitiche dei laboratori in Lombardia nel 2021 all'interno delle attività del programma VEQ diagnostica molecolare SARS-CoV-2 RNA è risultato di estremo valore per la pratica clinica e per la sanità pubblica (9,10,29-31). Infatti, questo programma VEQ ha permesso di controllare la qualità dell'attività diagnostica di un numero crescente nel tempo di laboratori e di sistemi in uso, di osservare elevate percentuali di PPA e di NPA e di stimare una accettabile variabilità tra metodi, dipendente principalmente dal target e dalla concentrazione virale nel campione.

Il maggior limite dello studio è che la concentrazione di SARS-CoV-2 ottenuta al termine dell'estrazione degli acidi nucleici dei campioni rappresentati dagli esercizi in esame così come il volume di input per il saggio di amplificazione del gene target potrebbero essere stati diversi tra i vari sistemi, sia manuali che automatici, ma dipendente dalle indicazioni del produttore del saggio analitico stesso.

In conclusione, alla luce delle evidenze fornite dall'analisi dei risultati ottenuti, appare necessario continuare a implementare programmi di VEQ per la diagnostica molecolare di SARS-CoV-2 per fornire ai laboratori chiare indicazioni sulla qualità dei sistemi diagnostici utilizzati e sull'eventuale necessità di sostituirli, per promuovere l'uniformità dei risultati ottenuti in laboratori differenti anche ipotizzando la definizione di limiti di accettabilità per i valori di Ct, per sostenere l'adozione di metodi con tracciabilità metrologica.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano le instancabili donne e uomini che dalle trincee dei laboratori hanno contribuito in modo rilevante alla lotta contro SARS-CoV-2.

BIBLIOGRAFIA

1. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020;395:565-74.
2. Carvalho T, Krammer F, Iwasaki A. The first 12 months of COVID-19: a timeline of immunological insights. *Nat Rev Immunol* 2022;21:245-56.
3. Dutta D, Naiyer S, Mansuri S, Soni N, Singh V, Bhat KH, et al. COVID-19 Diagnosis: A Comprehensive Review of the RT-qPCR Method for Detection of SARS-CoV-2. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12:1503.
4. Artika IM, Dewi YP, Nainggolan IM, Siregar JE, Antonjaya U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: current techniques, applications, and role in COVID-19 diagnosis. *Genes (Basel)* 2022;13:2387.
5. Khalid MF, Selvam K, Jeffry AJN, Salmi MF, Najib MA, Norhayati MN, et al. Performance of rapid antigen tests for COVID-19 diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Diagnostics (Basel)* 2022;12:110.
6. Yu XL, Xie JW, Wang M, Lin MQ, Zheng YW, Lin LR.

- Evaluating the value of anti-SARS-CoV-2 antibody-based tests for COVID-19 diagnosis. *J Clin Med* 2022;11: 7489.
7. Vandenberg O, Martiny D, Rochas O, van Belkum A, Kozlakidis Z. Considerations for diagnostic COVID-19 tests. *Nat Rev Microbiol* 2022;19:171-83.
 8. World Health Organization. WHO technical guidance on COVID-19 Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance>. (ultimo accesso: Marzo 2023).
 9. Ceriotti F, Cobbaert C. Harmonization of External Quality Assessment Schemes and their role - clinical chemistry and beyond. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:1587-90.
 10. Matheussen V, Corman VM, Donoso Mantke O, McCulloch E, Lammens C, Goossens H, et al. International external quality assessment for SARS-CoV-2 molecular detection and survey on clinical laboratory preparedness during the COVID-19 pandemic, April/May 2020. *Euro Surveill* 2020;25:2001223.
 11. Regione Lombardia. Decreto Direzione Generale Sanità di Regione Lombardia n. 3447. 2011.
 12. Pasotti F, Pellegrinelli L, Liga G, Rizzetto M, Azzarà G, Da Molin S, et al. First results of an external quality assessment (EQA) scheme for molecular, serological and antigenic diagnostic test for SARS-CoV-2 Detection in Lombardy Region (Northern Italy), 2020-2022. *Diagnostics (Basel)* 2022;12:1483.
 13. Decreto del Presidente della Repubblica 14 gennaio 1997. Approvazione dell'atto di indirizzo e coordinamento alle regioni e alle province autonome di Trento e di Bolzano, in materia di requisiti strutturali, tecnologici ed organizzativi minimi per l'esercizio delle attività sanitarie da parte delle strutture pubbliche e private. G.U. Serie Generale n. 42 del 20 febbraio 1997.
 14. DGR n. VII/3313 – Approvazione delle direttive in ordine all'attuazione delle disposizioni di cui alla l.r. 15/1999 art. 4, comma 4, relative ai Servizi di Medicina di Laboratorio e all'attività di prelievo. Regione Lombardia. 02/02/2001.
 15. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020;25:2000045.
 16. Corman VM, Drosten C. Authors' response: SARS-CoV-2 detection by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020;25:2001035.
 17. Galli C, Pellegrinelli L, Bubba L, Primache V, Anselmi G, Delbue S, et al. When the COVID-19 pandemic surges during influenza season: lessons learnt from the sentinel laboratory-based surveillance of influenza-like illness in lombardy during the 2019-2020 season. *Viruses* 2021;13:695.
 18. UNI EN ISO 13528:2015. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison (2nd edition, 2015).
 19. Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*; 1999. p. 95-8.
 20. Patel R, Babady E, Theel ES, Storch GA, Pinsky BA, St George K, et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/ COVID-19. *mBio* 2020;11:e00722-20
 21. Chavda VP, Valu DD, Parikh PK, Tiwari N, Chhipa AS, Shukla S, et al. Conventional and novel diagnostic tools for the diagnosis of emerging SARS-CoV-2 variants. *Vaccines (Basel)* 2023;11:374.
 22. Hong KH, Lee SW, Kim TS, Huh HJ, Lee J, Kim SY, et al. Guidelines for laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Korea. *Ann Lab Med* 2020;40:351-60.
 23. Sung H, Roh KH, Hong KH, Seong MW, Ryoo N, Kim HS, et al. COVID-19 molecular testing in Korea: practical essentials and answers from experts based on experiences of emergency use authorization assays. *Ann Lab Med* 2020;40:439-47.
 24. Valadan R, Golchin S, Alizadeh-Navaei R, Haghshenas M, Zargari M, Mousavi T, et al. Differential gene expression analysis of common target genes for the detection of SARS-CoV-2 using real time-PCR. *AMB Express* 2022;12:112.
 25. Rahbari R, Moradi N, Abdi M. rRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical considerations. *Clin Chim Acta* 2021;516:1-7.
 26. Kogoj R, Korva M, Knap N, Resman Rus K, Pozvek P, Avšič-Županc T, et al. Comparative evaluation of six SARS-CoV-2 Real-Time RT-PCR diagnostic approaches shows substantial genomic variant-dependent intra- and inter-test variability, poor interchangeability of cycle threshold and complementary turn-around times. *Pathogens* 2022;11:462.
 27. Oranger A, Manzari C, Chiara M, Notario E, Fosso B, Parisi A, et al. Accurate detection and quantification of SARS-CoV-2 genomic and subgenomic mRNAs by ddPCR and meta-transcriptomics analysis. *Commun Biol* 2021;4:1215.
 28. Fukasawa LO, Sacchi CT, Gonçalves MG, Lemos APS, Almeida SCG, Caterino-de-Araujo A. Comparative performances of seven quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction assays (RT-qPCR) for detecting SARS-CoV-2 infection in samples from individuals suspected of COVID-19 in São Paulo, Brazil. *J Clin Virol Plus* 2021;1:100012.
 29. Buchta C, Camp JV, Jovanovic J, Chiba P, Puchhammer-Stöckl E, Mayerhofer M, et al. The versatility of external quality assessment for the surveillance of laboratory and. *Clin Chem Lab Med* 2021;59:1735-44.
 30. Li RH, Wang QY. A localized small-scale external quality assessment (EQA) for PCR testing of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in the molecular laboratories. *J Virol Methods* 2022;301:114441.
 31. Pan J, Yan H, Li Z, Lou X, Mao H, Shi W, et al. An external quality assessment for the molecular testing of the SARS-CoV-2 virus genome in Zhejiang Province, China. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2022;104:115766.