

## **I saggi immunometrici qualitativi: valutazione e controllo**

### **Milano, 19 Gennaio 2005**

Guest Editor: Renzo Malvano

#### **Introduzione al corso**

**Carlo Franzini,**  
Università di Milano

Nel corso del loro sviluppo le tecnologie analitiche applicate nel laboratorio clinico hanno sempre più assunto il carattere delle così dette "analisi strumentali". Cuore di ogni analisi strumentali è un "principio analitico", ossia una reazione che consente di "riconoscere" la molecola misuranda, generando di conseguenza un "segnale" misurabile, di intensità proporzionale alla concentrazione della molecola medesima. Nel corso degli anni i principi analitici sono passati dal chimico (e/o chimico-fisico), all'enzimatico, all'immunochimico, alla ibridazione. I primi tre principi sono applicabili alla misurazione di una ampia varietà di molecole; l'ibridazione è riservata agli acidi nucleici. Nel medesimo ordine, passando dal primo all'ultimo principio, si è ottenuto un incremento della sensibilità e della specificità dei procedimenti di misura, con evidenti vantaggi analitici e clinici. Nella stragrande maggioranza dei procedimenti, opportuni accorgimenti associamo la reazione di riconoscimento alla generazione di un segnale ottico, ossia di assorbimento o di emissione di energia luminosa.

Al loro esordio la maggior parte dei procedimenti è passata attraverso una fase "qualitativa", legata ad una valutazione visiva (colore, torbidità, precipitazione) ma anche strumentale della intensità del segnale. In tale approccio il risultato veniva emesso in ermini dicotomici (positivo/negativo), eventualmente arricchiti della definizione di una zona intermedia di incertezza (detta spesso "zona grigia"). L'utilizzazione critica dei risultati applicati alla medicina ed alla tutela della salute ha tuttavia chiaramente evidenziato una realtà prevedibile, ossia il maggiore contenuto di informazione del risultato "quantitativo", costituito da un valore numerico, rappresentante un variabile continuo, e dalla relativa unità di misura, o, in alternativa, da un valore normalizzato per esempio ad un valore definitivo come soglia.

Oggi l'espressione della misurazione in termini quantitativi è diventata una regola, ed i vantaggi ai fini della interpretazione medica del risultato sono ampiamente riconosciuti. La classificazione del risultato (positivo/negativo, od altro) è da considerarsi un intervento di seconda istanza, interpretativo e non analitico. Esistono tuttavia alcuni problemi.

La metodologia sottolinea con sempre maggiore e giusta insistenza che ogni valore numerico si accompagna inevitabilmente ad un suo "budget" di incertezza, dipendente dalle caratteristiche analitiche (precisione ed esattezza) del metodo. Ciò ha alcune importanti conseguenze:

- anche a valore di concentrazione zero della molecola misuranda (ossia in sua assenza) l'incertezza intrinseca della misura genera un segnale, da cui si ricava un valore di concentrazione che non esiste; per ovvii motivi, questo punto è particolarmente critico nella immunometria applicata alla sierologia infettivologica (misurazione di antigeni e di anticorpi nel siero);
- ogni risultato dovrebbe essere riportato in associazione con la sua "inerente" incertezza: ciò non è semplice e potrebbe generare referti di più complessa lettura, ma sicuramente aumenterebbe la significatività della interpretazione clinica;
- si dà implicitamente per scontato che le caratteristiche dei metodi impiegati siano note, e che siano accettate in quanto capaci di generare risultati caratterizzati da una incertezza ancora compatibile con gli scopi medici. E' quindi necessario conoscere ed eventualmente valutare l'incertezza della misura, confrontandone l'entità con i requisiti analitici dettati dalle finalità mediche dell'esame;
- è anche necessario che vengano attuati opportuni sistemi di controllo (di risultato e/o di processo) che accertino quando e quanto le caratteristiche di un procedimento si vanno deteriorando al limite di rendere la attendibilità dei risultati non più congruente con gli scopi prefissati.

Questi argomenti, ed altri pertinenti, sono stati oggetto di un corso di aggiornamento tenuto a Milano il 19 Gennaio 2005: BC è lieta di presentare ai lettori i riassunti delle relazioni.

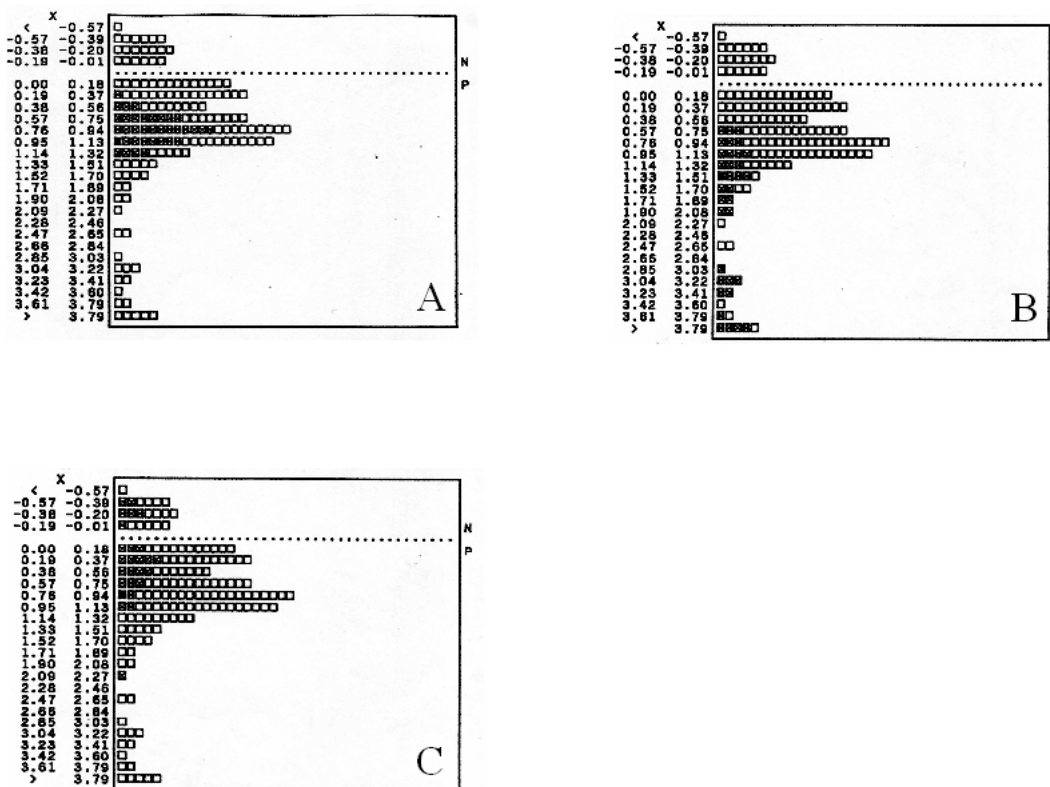
**I saggi immunometrici qualitativi: valutazione e controllo**  
 Milano, 19 Gennaio 2005

**Parametri e procedimenti di valutazione dei saggi qualitativi**

**Renzo Malvano**  
 Biomedica s.r.l., Milano

I criteri di valutazione e controllo dei saggi qualitativi basati sulla classificazione dicotomica positivo/negativo dei risultati, ancorché largamente impiegati, sono da considerarsi scarsamente informativi. E non molto aggiunge, di fatto, l'utilizzazione di uno schema classificatorio positivo/dubbio/negativo, in cui la regione d'incertezza (come peraltro il valore discriminante, "cutoff") viene generalmente indicata dai produttori di kit usualmente senza fornirne una spiegazione. Riteniamo che dovrebbe invece essere sfruttato il potenziale informativo derivabile (a) dalla "quantificazione" delle risposte, normalizzandole rispetto al valore discriminante, e (b) dall'esplicitazione della funzione concentrazione/risposta (concentrazione non necessariamente definita, ma anche concernente la diluizione di un campione positivo di riferimento). A proposito di quest'ultimo punto va notato che per i saggi immunometrici non competitivi di interesse trasfusionale (saggi per HBsAg, anti-HCV, anti-HIV cui è essenzialmente dedicato questo corso) la funzione di risposta, lineare su un ampio intervallo di concentrazione, può ottenersi mediante l'impiego di un campione negativo e di un singolo positivo opportunamente scelto. Naturalmente per i metodi competitivi, quali ad esempio quelli per antiHbc, la definizione della funzione di risposta curvilinea presuppone l'impiego di più campioni positivi a diversa concentrazione, comportando pertanto un maggior costo di valutazione.

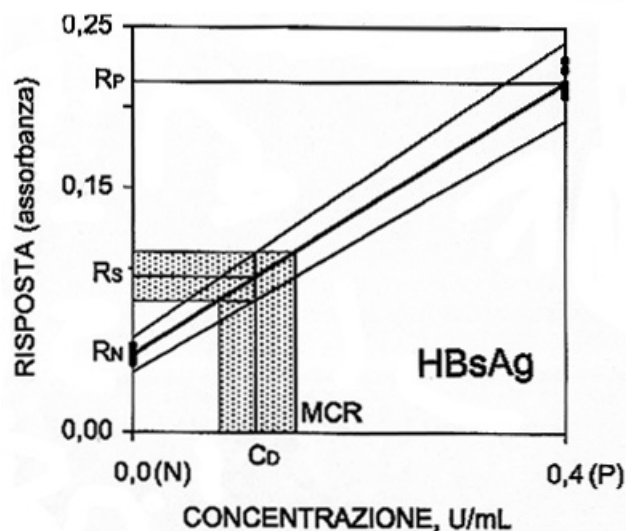
La rappresentazione cumulativa delle risposte normalizzate permette un confronto diretto tra differenti metodi, indipendentemente dal tipo di segnale impiegato (valori di densità ottica, fluorescenza, luminescenza, velocità di conteggio, ecc), fornendo così un decisivo incremento informativo nella valutazione esterna di qualità (VEQ) e, più in generale, nel confronto tra le prestazioni di diverse tecniche analitiche. Un esempio è fornito nella Figura 1 che riporta l'istogramma di frequenza delle risposte normalizzate al valore soglia ottenute per un campione di controllo per HBsAg. L'approccio esemplificato, da noi utilizzato nei programmi di VEQ già una quindicina di anni fa, consente a ciascun partecipante al controllo non solo di reperire immediatamente la propria collocazione rispetto al valore di discriminazione positivo/negativo, ma anche di essere informato — in dipendenza dalla distanza da tale valore — sul grado



**Figura 1**  
 Esempio di rapporto di VEQ per un campione debolmente positivo per HBsAg (ca. 0,2 U/mL), inviato a tre diversi partecipanti al programma. In ordinata sono riportati i valori di risposta e in ascissa la frequenza; a ciascun dato viene sottratto 1, per cui il valore soglia coincide con lo zero e i risultati positivi e negativi assumono, rispettivamente, il segno algebrico + e -. La collocazione del laboratorio destinatario dell'informazione è indicata dal simbolo nero e la distribuzione dei dati afferenti al kit utilizzato dal ricevente è indicata dai simboli tratteggiati. Si notino le differenze di prestazioni dei kit evidenziati in A, B e C, riguardo esattezza (classificazione corretta positivo/negativo) e precisione (dispersione delle risposte)

di sicurezza dei risultati corretti e sull'entità dell'errore di quelli scorretti. La quantificazione dei risultati qualitativi rende ovviamente possibile l'ottenimento di dati statistici di interesse per la VEQ, quali i valori medi e mediani, gli intervalli di distribuzione, i parametri di variabilità.

L'esplicitazione della funzione di risposta consente di derivarne un parametro di controllo efficace, correlato alla morfologia (pendenza e intercetta) della funzione stessa, quale la concentrazione corrispondente al valore discriminante positivo/negativo. Come esemplificato nella Figura 2 è inoltre possibile la definizione della "zona grigia" di incertezza della funzione di risposta, al livello di probabilità desiderato (in dipendenza dal grado di replicazione delle misure dei campioni di controllo). Da questa possono essere desunti parametri utili per valutazioni comparative, come l'estensione della regione di incertezza attorno alla concentrazione "discriminante" e la minima concentrazione rilevabile (sensibilità analitica) che di tale regione rappresenta il limite superiore. Un dato importante, di interesse trasfusionale, è infine quello correlato al limite inferiore della zona grigia di incertezza attorno alla risposta soglia (scelta in genere dalla ditta produttrice del kit utilizzato), da impiegarsi come criterio di accettazione o rifiuto delle donazioni di sangue: va qui specificato, a questo proposito, che per la risposta negativa occorrerebbe valutare la variabilità biologica e non limitarsi alla variabilità analitica (certamente introducendo, così, una complicazione operativa).



**Figura 2**

Parametri valutativi derivabili dalla funzione concentrazione/risposta (lineare nell'esempio) e dalla fascia di incertezza (95%) attorno alla funzione stessa. Nell'esempio sono utilizzati quintuplicati di risposta per il controllo negativo e il controllo positivo; le risposte medie sono indicate con RN e RP, la risposta soglia (suggerita dalla ditta produttrice) con RS e la corrispondente concentrazione discriminante con CD. MCR corrisponde alla minima concentrazione rilevabile al livello di probabilità prescelto.

## Correlazione e analisi della regressione: alcuni approfondimenti

**Andrea Chiecchio**

Laboratorio Isotopi della Struttura Complessa di Fisica Sanitaria, ASO Ordine Mauriziano, Torino

Quando si prendono in considerazione congiuntamente due o più variabili quantitative, oltre alle analisi sulle statistiche descrittive valutate sui campioni di realizzazioni di ciascuna variabile (media, varianza, errore standard, ecc), è possibile esaminare anche il tipo e l'intensità delle relazioni che sussistono tra le differenti variabili: nel caso di due sole variabili (ad esempio, una Concentrazione di farmaco, D, e la Risposta, R, a quella Concentrazione), è relativamente facile verificare se esse varino simultaneamente secondo una relazione lineare, del tipo  $D=bR+a$ , e quantificare le statistiche di pendenza "b", intercetta "a" e coefficiente di correlazione "r" (Figura 1), valutandone i singoli errori.

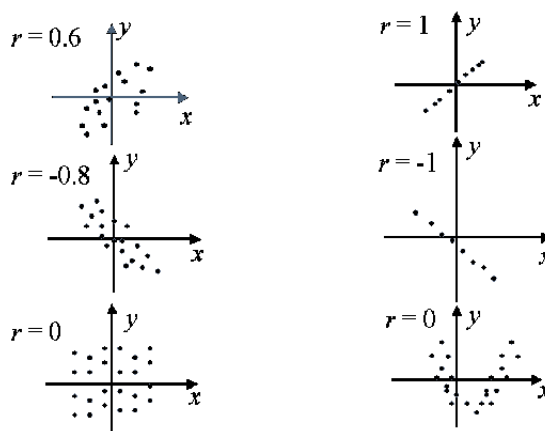
In presenza di una relazione lineare di questo tipo tra le due variabili, è possibile chiedersi se la tendenza calcolata sia significativa, cioè caratteristica anche della popolazione, oppure debba essere ritenuta apparente, effetto probabile di variazioni casuali del campione. Inoltre, l'analisi congiunta delle due variabili offre al ricercatore l'opportuni-

**I saggi immunometrici qualitativi: valutazione e controllo**  
 Milano, 19 Gennaio 2005

tà di predire il valore di una variabile quando l'altra sia nota (ad esempio, come valutare in un gruppo d'individui la Risposta media per una certa Concentrazione). Sono ovviamente necessarie alcune ipotesi minime sull'andamento dei dati, senza le quali le valutazioni statistiche sull'attendibilità di stime e di previsioni diventano più complesse da ottenere. Tra queste c'è la "normalità" della distribuzione della variabile dipendente, l'assenza di errore della variabile indipendente e l'omoscedasticità (o "relazione caratterizzata da una variabile dipendente con errore costante su tutto l'intervallo dei suoi valori") spesso trascurata dal ricercatore, anche se quasi mai esattamente verificata (Figura 2).

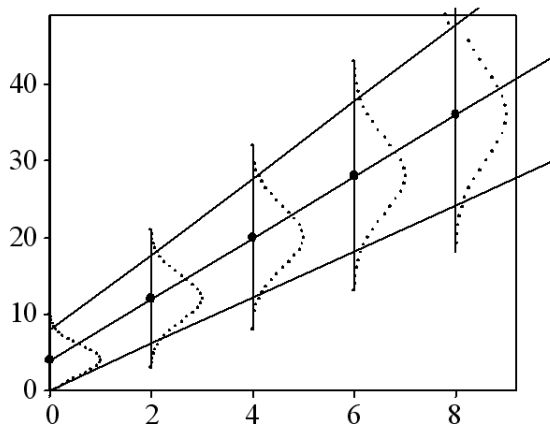
Quanto visto comporta, nel caso non si verifichino le ipotesi di cui si è detto, o si verifichino in modo molto approssimativo, che non risulti così scontata la determinazione rigorosa dell'incertezza associata alle valutazioni della "zona grigia" estesa a tutto l'intervallo della variabile dipendente in funzione del valore della variabile indipendente (o pre-

**r di Correlazione**



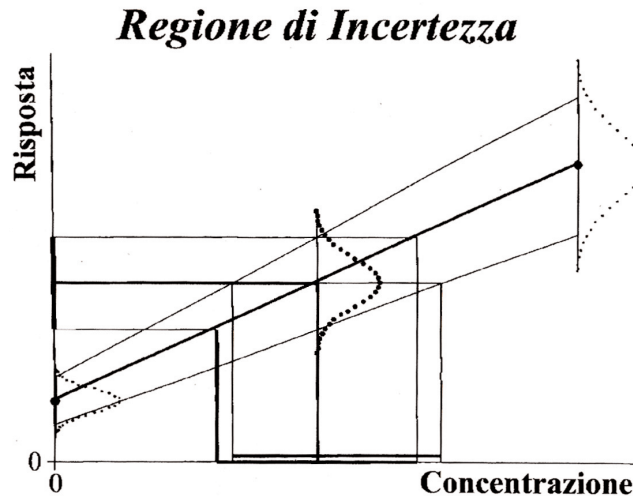
**Figura 1**  
 Alcuni esempi di relazione tra le variabili con i relativi valori del coefficiente di correlazione  $r$ . Si noti che  $r$ , nell'ipotesi di linearità, misura l'intensità (o la forza) del legame e la "direzione" della relazione (diretta, positiva, e inversa, negativa). Si noti l'ultimo grafico in basso a destra che sottolinea l'importanza della linearità della relazione ai fini di un corretto utilizzo della misura  $r$ .

**Regione di Confidenza in assenza di omoscedasticità**



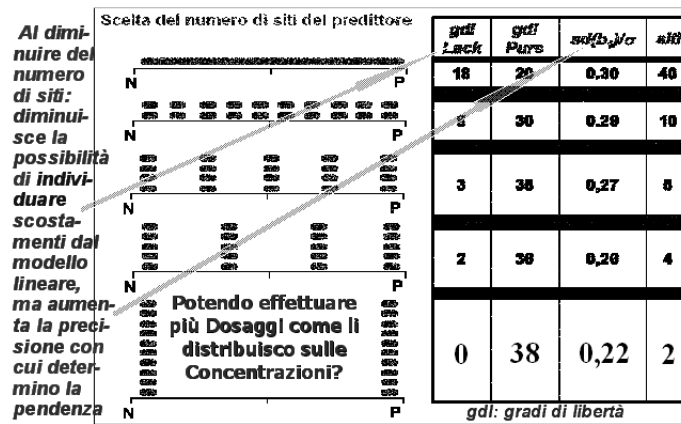
**Figura 2**  
 Tipica situazione "eteroscedastica" in presenza di una relazione lineare. Si noti l'andamento ad imbuto della zona di incertezza, costruita per semplicità unendo gli estremi degli intervalli di confidenza (oppure di tolleranza) costruiti intorno ad alcuni valori della variabile dipendente (la Risposta). La situazione "non omoscedastica" qui illustrata caratterizza apprezzabilmente le determinazioni analitiche della medicina trasfusionale.

ditore), la cui grandezza si riverbera sull'incertezza associata alle nostre stime e previsioni. A questo proposito, in Figura 3 si può osservare come anche il più semplice approccio alla "indeterminatezza" del predittore (Concentrazione), noti i valori della variabile dipendente (Risposta) e la sua "zona grigia" sull'intero intervallo — ottenuta congiungendo gli estremi dei singoli intervalli di confidenza o tolleranza della Risposta ai due soli diversi livelli



**Figura 3**  
Determinazione dell'intervallo di incertezza attorno al valore della Concentrazione (desunto della Risposta), secondo i due differenti approcci illustrati nel testo. Le differenze tra i due approcci risultano del tutto trascurabili; si tenga anche conto del fatto che il metodo semplificato per determinare l'™ di incertezza (unendo gli estremi dei singoli intervalli di incertezza della Risposta) permette valutazioni poco più che qualitative (nel senso che un certo LC% per la Risposta non si traduce automaticamente nello stesso LC% per la Concentrazione, ma in un valore inferiore non facilmente stimabile).

### Sulla Regressione e la Correlazione: numero di siti e ripetizioni per sito



**Figura 4**  
Sono riportate:  
(a) sulla sinistra, le 5 possibili configurazioni analizzate, da 40 siti con 1 misura per sito (in alto) a 2 siti con 20 ripetizioni della misura per ogni sito (in basso), distribuite tra gli estremi dell'intervallo di concentrazione, quella nulla (N) e quella massima (P);  
(b) sulla destra, una tabella di 5 righe (le differenti configurazioni viste sopra) e 4 colonne (gli indicatori presi in considerazione per valutare la capacità di ognuna delle configurazioni di essere sensibile agli scostamenti dalla linearità ed efficace ai fini della riduzione dell'imprecisione sulla pendenza della retta di regressione, in funzione del numero di siti indicati nella colonna più a destra); gli indicatori sono rappresentati dalla prima colonna (gradi di libertà associati agli scostamenti dalla linearità, i "gdl Lack", che tendono a zero con il diminuire del numero dei siti, segnalando una progressiva perdita di sensibilità agli scostamenti dalla linearità, a fronte dell'incremento dei gradi di libertà dell'errore sulla regressione, i "gdl Pure") e dalla terza colonna (errore sulla pendenza, normalizzato all'errore teorico, sd(b)/σ, che diminuisce al crescere delle ripetizioni su ogni sito, segnalando un progressivo aumento della precisione del valore della statistica "b").

## I saggi immunometrici qualitativi: valutazione e controllo

Milano, 19 Gennaio 2005

della Concentrazione, N e P — comporti almeno due diverse modalità di soluzione. Per la prima, si invertirà il valore di Risposta media proiettandola, attraverso le rette che delimitano l'“imbuto” della zona grigia, sull'intervallo dei valori della Concentrazione, attorno a un opportuno valore stimato desunto dalla retta di regressione; nel secondo caso si invertirà l'intero intervallo di confidenza (o di tolleranza, con il suo massimo e il suo minimo) proiettandolo, attraverso la sola retta di regressione, sull'asse della Concentrazione.

Per finire, tra le possibili applicazioni dell'analisi della regressione, ricordiamo l'aiuto che ci fornisce nella scelta del “progetto di esperimento” analitico ottimale, quantificando per ogni scelta il numero di siti del predittore e delle ripetizioni delle misure della risposta su ogni sito, a parità di “costo complessivo” dell'esperimento. Così, in Figura 4, è riportato che cosa succede — rispetto alla nostra capacità di rilevare relazioni NON lineari e, contemporaneamente, di determinare la pendenza della retta con la massima precisione possibile — distribuendo un opportuno numero di determinazioni analitiche (40) su un numero di siti che varia dal massimo possibile (con una sola determinazione per Concentrazione) al minimo possibile (2 soli livelli di Concentrazione), caratteristico proprio del caso trasfusionale.

### Il significato dei saggi immunometrici nel percorso diagnostico-terapeutico: l'esempio dell'epatite B

Ferruccio Bonino<sup>1</sup>, Maurizia Rossana Brunetto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Direzione Scientifica Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

<sup>2</sup>UO Gastroenterologia e Epatologia, Azienda Ospedaliera Universitaria, Pisa

La florida produzione di antigeni (HBsAg e HBeAg) da parte dell'HBV e la vivace risposta anticorpale (anti-HBc, anti-HBs e anti-HBe) da parte del sistema immune del soggetto infettato hanno favorito la messa a punto di tecniche immunometriche che hanno permesso lo sviluppo di una fine diagnostica dell'infezione e malattia da HBV, molti anni prima che le metodiche di biologia molecolare diventassero di uso corrente nel laboratorio di virologia clinica. Dagli anni '80 in poi l'introduzione di metodiche in grado di determinare l'acido nucleico virale (HBV-DNA) in modo sempre più sensibile ha ulteriormente contribuito a migliorare la gestione del portatore di infezione da HBV.

Attualmente si dispone di un ampio spettro di marcatori che permettono di rispondere puntualmente ai quesiti diagnostici principali, che sono: se il soggetto è stato esposto al virus, se è immunizzato o infettato, e in quest'ultimo caso se presenta replicazione virale e/o malattia epatica virus indotta (Tabella).

Per applicare ed interpretare correttamente i test non è sufficiente conoscere il significato diagnostico del marcatore, ma occorre anche avere presente la sua cinetica nel corso dell'infezione. Ad esempio, l'infezione da HBV è stata ed è tuttora distinta in fasi sulla base della presenza in circolo di un antigene o dell'omologo anticorpo (HBsAg/anti-HBs, HBeAg/anti-HBe). In realtà studi sulla risposta umorale hanno dimostrato come immunocomplessi antigene/omologo anticorpo siano presenti molto tempo prima e dopo la sierconversione: ne deriva che un basso titolo di anti-HBs può indicare la persistenza di una risposta anticorpale anamnesticca anni dopo l'esposizione primaria risolta, ma può anche indicare la presenza di un'infezione cronica con bassa produzione antigenica. La presenza di un alto titolo, al contrario, indica una florida risposta anticorpale in assenza di una significativa produzione antigenica. Nel caso di un anticorpo per il quale l'antigene libero non è circolante il significato di un basso titolo indica una minima o assente esposizione antigenica, mentre l'alto titolo è suggestivo di una persistente e significativa stimolazione antigenica. Ne deriva che titolo medio-alti di anti-HBc, in assenza di anti-HBs, possono essere la spia di un'infezione cronica B. Negli ultimi anni la sempre più estesa applicazione di tecniche di biologia molecolare ad elevata sensibilità ha dimostrato la presenza di sequenze dell'HBV anche in soggetti senza alcun marcatore di avvenuta esposizione al virus. Gli studi fino ad ora condotti suggeriscono che la presenza di infezione da HBV “occulta” in paziente con epatopatia di altra eziologia possa essere associata a più severa evolutività e minore risposta ad esempio alle terapie antivirali. Al momento, tuttavia non si dispone di dati definitivi che permettano di definire gli ambiti clinici nei quali la ricerca dell'infezione occulta da HBV sia da suggerire per migliorare l'inquadramento diagnostico del paziente.

Una rilevante implicazione clinica ha invece la definizione del significato clinico e la definizione degli ambiti di utilizzo dei test per la determinazione dell'HBV-DNA. I livelli viremici nel corso dell'infezione da HBV variano notevol-

Marcatori virali	Categorie diagnostiche
Anti-HBs	Immunità
Anti-HBc	Esposizione
HBsAg	Infezione
HBV-DNA, HBeAg	Replicazione
IgM anti-HBc	Malattia

mente nelle diverse fasi dell'infezione (da  $>10^9$  a  $<10^2$  cp/mL) e le metodiche disponibili hanno sensibilità (da  $10^6$  cp/mL a  $10^2$  cp/mL) e range dinamici fra loro notevolmente differenti. Ne deriva che i diversi test non sono tra loro alternativi, ma piuttosto complementari. L'introduzione delle tecniche di amplificazione degli acidi nucleici nella diagnostica corrente ha dimostrato come bassi livelli replicativi ( $10^3$ - $10^4$  cp/mL) possono essere presenti in portatori di HBV senza evidente danno biochimico. Alla luce di tali evidenze e dei nuovi strumenti diagnostici, le recenti Consensus Conference organizzate dal National Institute of Health (NIH) e dall'Associazione Europea per lo studio del fegato (EASL) hanno cercato di ridefinire lo stato del portatore sano (identificato da livelli di viremia non dosabili con tecniche di ibridizzazione e transaminasi persistentemente normali) per adottare quella di portatore a bassa replica (definito da livelli di viremia non dosabili con la PCR o comunque inferiori a  $10^5$  cp/mL). Tale definizione è tuttavia ancora oggetto di discussione e di rivalutazione clinica; in particolare saranno necessari ulteriori studi per meglio validare tale soglia viremica. Infatti, livelli viremici  $>$  di  $10^5$  cp/mL sicuramente correlano con la presenza di attiva replicazione virale e danno epatico, nel soggetto specificamente attivato nei confronti di HBV. Però, livelli  $<$  a  $10^5$  cp/mL, non necessariamente coincidono con uno stato di inattività dell'infezione, in quanto i pazienti anti-HBe positivi con malattia intermittente possono avere viremia inferiore a  $10^5$  cp/mL nelle fasi di temporanea remissione. Ne deriva che la definizione diagnostica del portatore anti-HBe positivo con bassi livelli di viremia non può essere fatta sulla base di una singola osservazione, ma necessita di un adeguato monitoraggio (almeno 12 mesi) volto ad evidenziare eventuali riattivazione della replicazione virale e del danno epatico. Nella pratica clinica il marcatore che può contribuire alla definizione diagnostica sono gli anticorpi IgM anti-HBc, che se dosati con tecniche di adeguata sensibilità possono permettere di distinguere il soggetto con danno epatico HBV indotto dal portatore senza danno epatico.

Il percorso diagnostico nel soggetto portatore di infezione da HBV deve quindi prevedere la valutazione dello stato replicativo (presenza o assenza dell'HBeAg e livelli di HBV-DNA) e della presenza di danno virus indotto, in quanto la presenza di marcatori biochimici di danno epatico in un soggetto con infezione da HBV non può portare automaticamente alla diagnosi di epatite da HBV. Il paziente potrebbe infatti essere un portatore di HBV tollerante (con elevati livelli di replica) o in fase di controllo immune (con bassi livelli di replica) ed avere un danno epatico di altra eziologia (esotossico, da farmaci, dismetabolico). È quindi necessario sempre individuare nell'ambito dei portatori di infezione con evidenza di danno epatico, coloro che hanno un danno HBV indotto.

Il controllo della replicazione dell'HBV avviene per fasi successive: inibizione della replicazione virale, sieroconversione da HBeAg ad anti-HBe (per i soggetti HBeAg positivi), eventuale perdita dell'HBeAg con sieroconversione ad anti-HBs. Poiché la sieroconversione da HBeAg ad anti-HBs avviene mesi o anche anni dopo la risoluzione del danno epatico HBV indotto non può essere utilizzata come marcatore virale a breve termine di risposta al trattamento. Il primo evento che si verifica durante un efficace trattamento antivirale è la diminuzione dei livelli HBV-DNA nel siero. Tuttavia, l'inibizione anche profonda della replicazione virale, che è indotta dagli inibitori della polimerasi, non è sufficiente a garantire un controllo duraturo dell'infezione, se non avviene la sieroconversione HBeAg/anti-HBe, che costituisce, nei pazienti HBeAg positivi, il marcatore più accurato di avvenuto controllo della replicazione di HBV. Perciò il dosaggio dell'HBV-DNA resta la modalità più adeguata per verificare l'efficacia dei farmaci antivirali, ma non è adatto a predire l'andamento dell'infezione e della malattia dopo l'interruzione del trattamento. Questa limitazione diagnostica dell'HBV DNA spiega le difficoltà nell'identificazione di criteri predittivi di risposta nei pazienti affetti da epatite cronica B anti-HBe positiva dove un evento come la sieroconversione da HBeAg ad anti-HBe non è presente. Inoltre, nei pazienti anti-HBe positivi, l'accuratezza diagnostica dei marcatori standard è ridotta ulteriormente dalle importanti fluttuazioni della viremia e delle transaminasi (l'HBV-DNA può scendere sotto  $10^5$  genomi/mL e le ALT possono temporaneamente normalizzarsi) che caratterizzano l'andamento di malattia in una elevata percentuale di casi. Gli anticorpi anti-HBc di classe IgM (IgM anti-HBc), utilizzati per la diagnosi dell'epatite acuta del tipo B, ma presenti a bassi livelli anche nei pazienti con dell'epatite cronica B, sono un marcatore surrogato di danno epatico HBV indotto e, nei portatori anti-HBe positivi sono utili per identificare i soggetti con epatite cronica e monitorare l'attività di malattia. Studi in pazienti con esacerbazioni necrotiche intercorrenti hanno dimostrato l'elevata accuratezza diagnostica delle IgM anti-HBc nell'evidenziare il danno epatico HBV indotto. Inoltre l'uso di questo anticorpo nel monitoraggio dopo trattamento si è mostrato utile nell'identificare i pazienti con una risposta sostenuta. Pertanto, la combinazione dei test sia di biologia molecolare (HBV-DNA) che immunometrici (IgM anti-HBc) dovrebbe essere proposta per migliorare l'accuratezza diagnostica nel monitoraggio della risposta alla terapia nei pazienti anti-HBe positivi.

Per riassumere, all'inizio del trattamento la quantizzazione dell'HBV-DNA è utile per verificare la suscettibilità al farmaco e l'efficacia del trattamento sia nei pazienti HBeAg che in quelli anti-HBe positivi. L'uso di questo test durante il trattamento con analoghi nucleosidici permette di identificare la risposta virologica completa, che è caratterizzata dalla caduta della viremia al di sotto della soglia di sensibilità delle tecniche di amplificazione ( $<200$  cp/mL), ma anche il ripresentarsi della replicazione virale in corso di terapia, evento che generalmente è espressione della comparsa dei mutanti resistenti all'antivirale. Una precoce identificazione delle recidive virologiche, che avvengono in genere alcuni mesi prima della recidiva dell'epatite, permette un intervento terapeutico tempestivo volto ad evitare severe esacerbazioni necrotiche potenzialmente pericolose. Conseguentemente è fondamentale definire in corso di trattamento con analoghi nucleos(t)idici il monitoraggio più adeguato, per garantire una precoce identificazione di eventuali *breakthrough* virologici.

## I saggi immunometrici qualitativi: valutazione e controllo

Milano, 19 Gennaio 2005

Attualmente il monitoraggio della viremia non predice la recidiva dopo sospensione del trattamento e non può essere utilizzato per definire la durata del trattamento. I dati disponibili suggeriscono che la risposta sostenuta al trattamento antivirale si associa alla persistenza dopo la sospensione della terapia di livelli viremici al di sotto di  $10^4$ - $10^5$  cp/mL. Ulteriori studi dovranno meglio definire i livelli e/o i profili viremici che correlano con i differenti profili di risposta al trattamento. Al momento attuale, dopo i primi mesi di trattamento, la sierconversione HBeAg/ anti-HBe è l'evento che identifica una elevata probabilità di risposta prolungata nei pazienti HBeAg positivi, mentre nei pazienti anti-HBe positivi la progressiva diminuzione e persistenza dopo la fine della terapia di livelli anti-HBc IgM al di sotto dei 4 UI PEI può essere considerato come il marcatore più affidabile di risposta sostenuta.

### Il controllo di qualità interno nel laboratorio di sierologia trasfusionale

**Carla Giustini**

UOC di Medicina Trasfusionale, Ospedale CTO A. Alesini, ASL Roma-C

Ci lascia perplessi l'abitudine corrente di adottare procedimenti valutativi e di controllo di metodi e risultati che non utilizzano pienamente il potenziale informativo della risposta numerica, risultando perciò scarsamente efficaci, come l'impiego di una carta di controllo costruita unicamente sulla risposta di un singolo campione, o l'adozione di una zona grigia della risposta "predefinita" per ciascun dosaggio. Ci riferiamo ai dosaggi immunometrici per HBsAg, anti-HCV e anti-HIV: trattandosi di metodi immunometrici qualitativi non competitivi, a risposta numerica continua lineare per un ampio intervallo di concentrazione, un approccio statisticamente corretto permette di esplicitare la funzione lineare, che correla la concentrazione (eventualmente nominale) delle specie reagenti con la risposta, incrementando notevolmente il valore informativo per ciò che concerne la valutazione e il controllo delle prestazioni analitiche. Sarà quindi sufficiente l'impiego di un controllo negativo e di un controllo positivo opportunamente scelto, per stimare i parametri della funzione di regressione che descrivono intrinsecamente la qualità analitica del metodo.

Nel nostro laboratorio utilizziamo venti replicati del controllo negativo e venti replicati del controllo positivo per ogni lotto di reagenti all'inizio del loro impiego per definire l'incertezza della funzione, abbiamo fissato limiti fiduciali del 95% e 99% e impieghiamo quintuplicati di risposta, con cadenza settimanale, per verificare la stabilità del valore dei parametri durante il periodo di utilizzo del lotto. E' ovvio che si debba preliminarmente verificare la linearità della funzione di risposta (da notarsi che il controllo positivo fornito con il kit potrebbe non essere adeguato: per esempio potrebbe avere una concentrazione di analita tale da uscire dalla fascia di linearità).

Dalla funzione di regressione e dalla sua incertezza, come si può osservare nella Figura 1 (dove in ascisse sono riportati i valori della concentrazione nominale e in ordinate le risposte normalizzate al valore soglia), è possibile procedere ad una definizione statisticamente rigorosa dell'ampiezza della "zona grigia" attorno alla risposta soglia, il cui limite inferiore costituisce il limite accettazione/rifiuto dell'unità di sangue; possiamo ricordare che per la valutazione della zona grigia vengono sovente seguiti approcci non chiaramente motivati e talora discutibili, e soprattutto ci preme sottolineare che l'ampiezza della zona grigia, essendo strettamente correlata alla funzione di risposta e alla sua fascia d'incertezza, sarà diversa per ciascun lotto di reagenti, ed è quindi del tutto arbitrario e poco scientifico prefissare (come purtroppo osserviamo addirittura come indicazione in alcune linee guida) un'ampiezza di zona grigia della risposta per ciascun dosaggio non tenendo conto non solo della variabilità fra lotti ma neppure fra metodi.

A conferma della validità di quanto detto riportiamo una recente esperienza: nel nostro Centro Trasfusionale due donatori hanno mostrato per il dosaggio HBsAg (V2) Abbott AxSYM valori al di sotto della soglia stabilita dalla casa produttrice collocandosi nella "zona grigia" della risposta da noi calcolata con il metodo descritto; avendo donato in tempi diversi, sono stati analizzati con due differenti lotti di reagenti le cui rispettive zone d'incertezza della risposta erano d'ampiezza diversa, di conseguenza differiva anche il loro limite inferiore che costituisce appunto il limite accettazione/rifiuto di cui sopra. I risultati dei due campioni, normalizzati al valore soglia, erano diversi e avremmo corso il rischio di classificare come negativo un campione che in realtà non lo era se avessimo fatto riferimento ad una "zona grigia predefinita", criterio abitualmente adottato nei laboratori. I due donatori erano HBV-DNA positivi (metodica PCR Cobas Ampliscreen HBV-Roche pool da 20 campioni).

Un parametro valutativo molto efficace è fornito dalla concentrazione discriminante (CD) vale a dire la concentrazione (o diluizione) corrispondente al valore soglia di risposta; è evidente che minore è il valore di CD più elevata sarà la sensibilità di rivelazione, motivo per cui il parametro CD può essere utilizzato nel controllo di qualità interno (CQI) con qualche vantaggio perché fornisce un'informazione direttamente correlata alla concentrazione, assai più sintetica dell'informazione di CQI derivabile dalla risposta dei controlli considerati individualmente come sovente accade.

Dalla funzione di regressione e dalla sua fascia d'incertezza intorno alla risposta soglia è possibile stabilire l'estensione della corrispondente "zona grigia" d'incertezza attorno alla CD, il cui limite superiore definisce correttamente la minima concentrazione rilevabile, valore che stima in modo statisticamente corretto la sensibilità di misura. Saranno quindi proprio i limiti della regione d'incertezza della concentrazione a definire i limiti della nostra carta di

controllo.

Come si può osservare nella Figura 2, il parametro che utilizziamo per il controllo della seduta analitica è la CD, in altre parole la concentrazione corrispondente al valore soglia che si ricava dalla funzione di regressione definita dal controllo negativo e dal controllo positivo inseriti nella seduta analitica, parametro statistico dipendente da pendenza e intercetta della funzione di risposta (che a sua volta riflette le caratteristiche dei reattivi e le condizioni di reazione). Tale parametro dipende anche dalla precisione di misura della risposta del controllo negativo e del controllo positivo; ricordiamo che il valore di discriminine è proposto come parametro di prestazione dall'European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS document 1: 1990, ISSN-6525, Lund Sweden, 1990).

Le concentrazioni incluse nei limiti della zona grigia della concentrazione daranno origine a classificazioni incerte al livello di probabilità prescelto, comportando quindi il rischio, più o meno grande, di incorrere in risultati falsi positivi e falsi negativi; pertanto la capacità classificatoria del metodo sarà inversamente proporzionale all'estensione della zona grigia di concentrazione. Si comprende quindi come zona grigia della concentrazione e MCR possano essere utilmente impiegati nella valutazione comparativa fra lotti e fra metodi. Ci sorprende che l'approccio qui descritto sia, di fatto, del tutto ignorato nella pratica corrente per la valutazione e il controllo della qualità dell'analisi qualitativa comportante un segnale analitico quantizzabile.

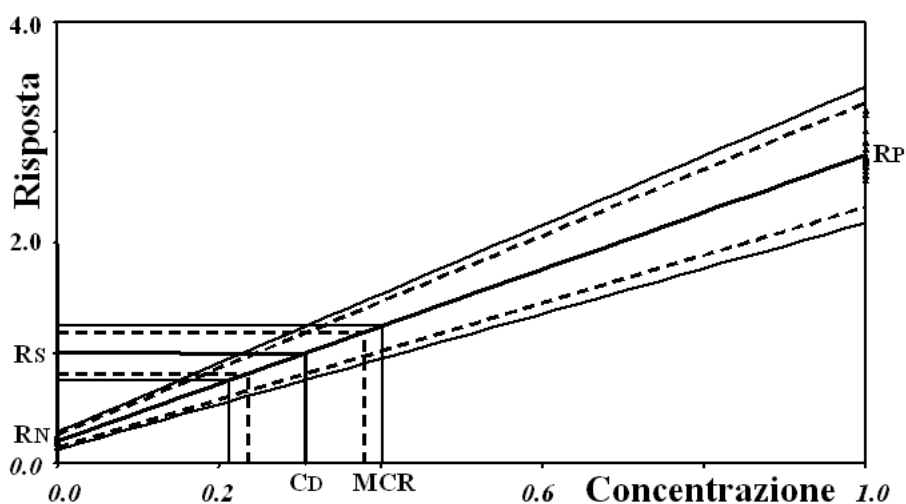
## Il controllo di qualità come processo da gestire

### Generoso Alfano

Dipartimento della Diagnostica, Azienda USL ROMA-D  
Servizio Trasfusionale, Ospedale G.B. Grassi, Ostia, Roma

Il controllo sistematico dei processi diagnostici e della qualità delle attività svolte per mezzo di controlli di qualità interni (CQI) e di attività di verifica esterna della qualità (VEQ) nei Laboratori diagnostici di Patologia clinica e nelle strutture trasfusionali sono attività richieste dalla normativa vigente, in primis, dal DPR 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".

In tale Decreto, con riferimento al punto 5 (gestione, valutazione e miglioramento della qualità, linee guida e regolamenti interni), viene esplicitato che i laboratori di analisi, i servizi di anatomia-istologia-citologia patologica e i cen-

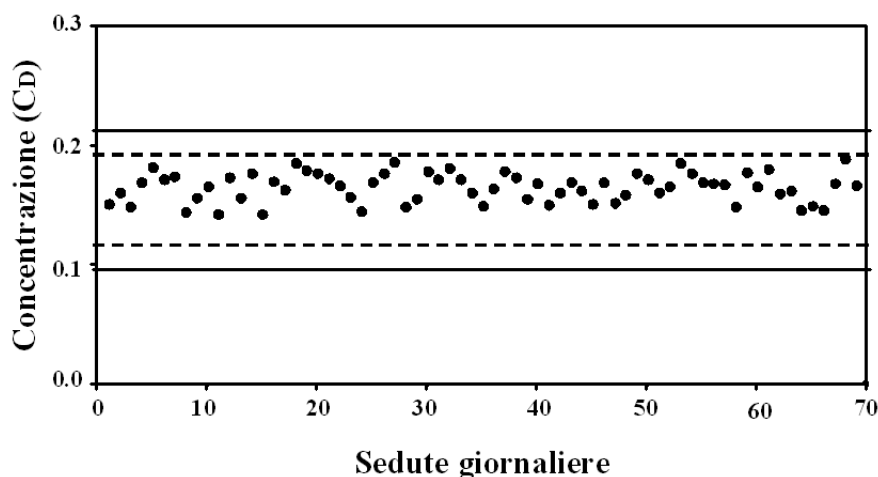


**Figura 1**

Definizione della "zona grigia di risposta" attorno al valore soglia RS e della "zona grigia di concentrazione" attorno alla concentrazione discriminante CD; nell'esempio riferito ad un saggio per anti-HCV, sono stati impiegati 20 replicati di misura di un controllo negativo (RN) e di un controllo positivo (RP) per il calcolo dei limiti di tolleranza al 95% (linea tratteggiata) e al 99% (linea continua) della funzione lineare concentrazione/risposta. Il limite superiore della zona grigia della concentrazione rappresenta la minima concentrazione rilevabile (MCR).

## I saggi immunometrici qualitativi: valutazione e controllo

Milano, 19 Gennaio 2005



**Figura 2**

Esempio, ancora per un saggio anti-HCV, di carta di controllo costruita utilizzando la concentrazione discriminante CD (pallini neri), i cui limiti superiori ed inferiori sono quelli della regione di incertezza della concentrazione ai due livelli di probabilità del 95% (linea tratteggiata) e del 99% (linea continua).

tri trasfusionali devono prevedere attività di controllo di qualità interne ed esterne e partecipare a programmi di miglioramento della qualità. Più oltre, con riferimento alla parte specifica per il settore della diagnostica di laboratorio concernente la "valutazione e miglioramento della qualità", viene richiesto al laboratorio di svolgere programmi di CQI e di partecipare a programmi di VEQ promossi dalle Regioni, o, in assenza di questi, a programmi validati a livello nazionale o internazionale. Più oltre, che i risultati dei controlli di qualità interno devono essere conservati per almeno un anno e quelli esterni per almeno tre anni.

Quale è, ad oggi, lo stato di conformità a tali requisiti? In molti laboratori, la esecuzione di tali controlli non viene svolta in maniera sistematica per tutti i settori della diagnostica, ma principalmente per i settori con analisi più frequenti o di maggiore impatto quali la chimica clinica, l'ematologia, i dosaggi ormonali. Più diffusa e sistematica è, viceversa, la attuazione dei controlli nella diagnostica immunometrica infettivologica nelle strutture trasfusionali. In queste strutture, la criticità derivante dall'impiego di metodiche qualitative e/o semiquantitative e la necessità di minimizzare il rischio di trasmissione di infezioni attraverso il sangue ed i suoi componenti fa sì che il CQI venga ricercato ed attuato come elemento di validazione del processo di screening ed al fine di accrescere la fiducia degli operatori sanitari sulla validità del processo diagnostico attuato. Anche la VEQ ancora non è svolta diffusamente così come non lo è sempre la analisi sistematica dei dati del CQI e della VEQ e la valutazione in relazione al loro andamento nel tempo. Le norme della serie ISO 9000:2000 invitano le organizzazioni a tener conto e rispettare i requisiti cogenti oltre a quelli del cliente e, in ciò, stimolano le organizzazioni ad attuare un "approccio per processi" poiché esso può aiutare le stesse a migliorare la propria capacità di rispondere alle esigenze dei clienti e soddisfare (e cioè: essere conformi ai requisiti di) tutte le parti interessate. L'approccio per sviluppare ed attuare un sistema di gestione della qualità prevede diverse fasi fra cui quella di determinare i processi e le responsabilità necessari per conseguire gli obiettivi per la qualità e quella di prevenire le non conformità eliminandone le cause. L'approccio per processi richiede all'organizzazione di identificare i processi, stabilire i metodi necessari per l'efficace funzionamento e controllo di tali processi, monitorare, misurare ed analizzare tali processi.

Con riferimento al requisito 7.5.1 della norma UNI EN ISO 9001:2000 relativo al controllo delle attività di produzione e di erogazione del servizio, viene richiesto che l'organizzazione deve svolgere dette attività "in condizioni controllate" e, a tal fine, si devono prevedere fra l'altro l'utilizzazione di "apparecchiature idonee" nonché la disponibilità di dispositivi per il monitoraggio e le misurazioni e l'attuazione delle stesse e, infine, devono anche prevedersi attività per il rilascio e la consegna dei prodotti. Per l'applicazione del requisito nelle attività di diagnostica di laboratorio, laddove si fa riferimento a dispositivi per il monitoraggio e le misurazioni sia il CQI che la VEQ possono essere considerati elementi necessari e sufficienti per soddisfare detto requisito. Allo stesso modo, la validazione delle sedute analitiche ottenuta attraverso la analisi e la valutazione del CQI può costituire la base per l'attuazione di attività rilascio e la consegna dei prodotti. Tenendo presente che, viceversa, i risultati dei programmi di VEQ possono essere più appropriatamente utilizzati per la "ri-validazione" dei processi (punto 7.5.2.f della norma).

Con riferimento alla necessità, richiesta dalla norma, di attuare sistematiche attività di misurazioni ed analisi utili al miglioramento continuo del sistema di gestione per la qualità delle organizzazioni, il possibile richiamo al CQI ed

alla VEQ lo troviamo nel punto 8.2.3 ove viene richiesto di adottare adeguati metodi per monitorare e misurare i processi e, più oltre, al punto 8.2.4 ove viene richiesto di monitorare e misurare anche le caratteristiche dei prodotti (le analisi) nelle diverse fasi della loro realizzazione per verificare che i relativi requisiti siano soddisfatti. Anche nel punto 8.4 della norma, ove viene richiesto all'organizzazione di raccogliere ed analizzare i dati, si può fare riferimento alle analisi e valutazioni svolte per esempio nel processo di CQI interlaboratorio e dal fornitore dei report della VEQ.

Fra gli elementi utili per una valutazione di conformità alla norma UNI EN ISO 9001:2000 nei laboratori, alcune evidenze utili alla dichiarazione di conformità della organizzazione alla stessa possono essere dati per il CQI da:

- valutazione dell'andamento nel tempo del CQI ( +/- 1ds; +/- 2ds)
- grado di soddisfazione di requisiti ulteriori (per es.: Regole di Westgard)
- rispetto dei tempi di conservazione delle registrazioni delle attività di CQI svolte

E per la VEQ da:

- valutazione dell'andamento nel tempo del programma di VEQ
- % dell'estensione del programma rispetto ai diversi analiti/settori
- rispetto dei tempi di conservazione delle registrazioni delle attività di VEQ svolte.

La gestione dei CQI e delle VEQ secondo i principi delle norme ISO 9000 consente dunque alle organizzazioni di garantire la soddisfazione dei requisiti della norma UNI EN ISO 9001:2000 relativi al controllo della produzione ed erogazione del servizio (Requisito 7.5.1), del requisito relativo alla validazione e ri-validazione dei processi (Requisito 7.5.2) nonché dei requisiti relativi al monitoraggio e misurazioni (della qualità) dei processi (Requisito 8.2.3) e dei prodotti/servizi (Requisito 8.2.4).

Riferimenti:

norma UNI EN ISO 9001:2000  
DPR 37 del 14 gennaio 1997.

## Il controllo di qualità tra opportunità e giurisprudenza

**Augusto D'Angiolino**

UOC di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale ASL Roma-B

Che la qualità paghi è un aforisma quanto mai noto a tutti coloro che hanno a che fare con un pubblico che si vorrebbero fidelizzare fino a farne dei clienti affezionati. Ma questo non è il solo motivo per il quale la qualità sia da perseguirsi. Molti sono i riferimenti alla qualità della prestazione. Da quello in ambito etico ("il medico dovrà, quali che siano le condizioni di esercizio, consacrarsi in tutta indipendenza tecnica e morale alla prestazione di cure di qualità, con passione e rispetto per la dignità umana" – Codice internazionale di etica medica) a quello più decisamente normativo e giurisprudenziale.

Anche relativamente al consenso preliminare ad ogni atto medico, il sanitario deve essere in grado di spiegare quello che intende fare, ma anche come intenda farlo! Deve essere in grado di documentare, al paziente come a chiunque abbia veste, quale sia stata la sua azione ed il valore della qualità di questa in quella specifica circostanza.

In altre parole, il prestatore d'opera in ambito analitico deve poter valutare e documentare la validità del valore (intesa come concordanza tra il valore medio proveniente da molte osservazioni ed il valore vero) e la certezza della misura (intesa come parametro associato al risultato di una misura che caratterizza la dispersione dei valori).

La necessità di inserire in ogni catena produttiva una serie di indicatori per procedere al maggior numero possibile di controlli, discende da regole di buon senso, di buona pratica e giuridiche. Come prassi, occorre poter dimostrare, ove ne ricorra la necessità, di essersi condotti al meglio e di aver adottato tutti i provvedimenti utili ad impedire l'evento pregiudizievole. In alcuni ambiti della medicina, quale per esempio quello trasfusionale e quello di laboratorio di analisi cliniche, l'inserimento di controlli di qualità è, oltre che necessario, definito per legge. In altri ambiti sono le norme di buona pratica di produzione o clinica a dettare regole per il controllo sistematico del ciclo operativo o, almeno, della credibilità del risultato.

Tutte le norme dell'ultimo decennio – come pure tutte le sentenze emesse nel periodo – sono univoche nel definire imprescindibili le operazioni inerenti al controllo di qualità del processo ed alla dimostrazione che il risultato ottenuto o il prodotto realizzato corrispondano a delle caratteristiche prefissate o promesse in anticipo.

Su tale base, occorre intraprendere sempre, insieme alla attività di servizio, una attività di controllo della bontà del servizio reso. Ciò sia per ottimizzare il proprio lavoro e l'impiego di risorse, sia per poter dimostrare, ove si determini un danno, di aver agito – oltre che con la perizia prevista – con la massima diligenza e prudenza possibile e nel

## I saggi immunometrici qualitativi: valutazione e controllo

Milano, 19 Gennaio 2005

rispetto delle norme regolanti la materia.

Naturalmente la qualità di tutta una filiera di lavoro inizia dalla idoneità degli strumenti utilizzati. Molte sono le norme che disciplinano la materia. Per quanto attiene alla idoneità dei reagenti già si poteva fare riferimento al D.M. 03.03.1987 che disciplinava l'impiego dei presidi medico-chirurgici e dei kit diagnostici, ma di più attualità la norma contenuta nel Dec. 2002/364 EC che detta norme sulle specifiche tecniche comuni per i dispositivi medico diagnostici in vitro. Per gli indicatori di qualità dei servizi e delle prestazioni, il riferimento è quello del D.M. 15.10.1996. ma già il D. L.vo 502/92 teorizzava sul miglioramento complessivo della qualità attraverso i controlli di qualità delle prestazioni; come pure il DPCM del 1 settembre 2000 disciplinava la tenuta di una adeguata documentazione sulla adozione e verifica della persistenza e implementazione di standard specifici sulla organizzazione, sui processi di gestione ed i relativi risultati e sui programmi di miglioramento.

Particolare rilevanza assumono, nell'ambito del quale si tratta, i test di screening di marcatori infettivologici, per i quali occorre adottare misure adeguate, quali controlli interni su reagenti e tecniche in uso, nonché controlli di qualità esterni da effettuare in un laboratorio di riferimento. Naturalmente, la puntuale registrazione della effettuazione dei controlli ed il loro esito rileva anche ai fini dell'art. 2697 c.c. relativo all'onere della prova ("chi vuol fare valere un diritto in giudizio deve provare i fatti che ne costituiscono il fondamento"). A tale ultimo fine, occorre utilizzare un sistema di valutazione dei risultati che sia indipendente e possa dimostrare che la procedura adottata ed i risultati ottenuti siano fondati ex ante su basi di concreta scientificità. Per avere una precisa visione di quanto sia necessario disporre di strumenti documentali idonei basti pensare alla possibilità di dover fronteggiare adeguatamente problematiche come previste dagli articoli 1218 c.c. (responsabilità del debitore: "il debitore che non esegue esattamente la prestazione dovuta è tenuto al risarcimento del danno, se non prova che l'inadempimento ...") e 1223 c.c. (risarcimento del danno), nonché la rilevanza di poter dimostrare di essersi condotti secondo le previsioni degli articoli 1175 c.c. (comportamento secondo correttezza) e 1176 c.c. (diligenza nell'adempimento). Da rilevare che, spesso, nell'ambito sanitario del quale si tratta, possono ricorrere le condizioni di applicazione dell'art. 2050 c.c. (responsabilità per l'esercizio di attività pericolose) che prevede che "chiunque cagiona danno ad altri ... è tenuto al risarcimento, se non prova di aver adottato tutte le misure idonee a evitare il danno. Tale concetto è ribadito, tra tante, dalla sentenza 21060/98 che recita: "Nel caso di attività oggettivamente pericolosa, con conseguente sottintesa applicabilità dell'art. 2050 c.c. che, come noto, contempla, per l'asserito responsabile una prova liberatoria assai più rigorosa che non quella di aver osservato la diligenza media (aver adottato tutte le misure idonee ad evitare il danno) ...". D'altra parte i concetti precedentemente espressi sono ben rappresentati nella sentenza della Suprema Corte (cfr. Cass. 13.05.1997, n. 4186) che, nell'ipotesi di danno prodotto a terzi per l'inosservanza di regole di correttezza, recita: "è sufficiente a dimostrare la colpa ... l'avvenuta violazione di queste regole, le quali, correlate ai doveri di prudenza, di diligenza, e di imparzialità e di legalità, costituiscono un limite esterno alla discrezionalità".

Circa l'obbligo giuridico, oltre che etico, di operare al meglio e nell'interesse dei pazienti, rileva anche la citazione di un altro pronunciamento della suprema Corte che puntualmente recita: "... la responsabilità ... per il risarcimento dei danni cagionati da una condotta omissiva sussiste non soltanto nel caso in cui questa si concretizzi nella violazione di una specifica norma ... ma anche quando detta condotta si ponga come violazione del principio generale di prudenza e diligenza di cui è espressione l'art. 2043 c.c."

Circa la opportunità e necessità della effettuazione di sistematici ed efficaci controlli di qualità in ogni ambito sanitario (ancora di più in quell'ambito dal quale da una risposta non corretta possa discendere un evento comunque pregiudizievole per il paziente) a prescindere dal rispetto delle varie norme in tal senso emanate, molto rileva – tenuto anche conto della necessaria tracciabilità dell'operato – la prescrizione per il professionista di dare "la dimostrazione dell'impossibilità a lui non imputabile della perfetta esecuzione della prestazione stessa" (cfr. Cass. Sent. 28.04.1963, n. 961) ed ancora, di utilizzare tutti i mezzi idonei al conseguimento del risultato, impegnandosi (se non a conseguirlo) ad utilizzare ogni risorsa disponibile per raggiungerlo (cfr. Cass. Sentenza citata).

In conclusione, l'adozione di un sistema di controllo di qualità che sia neutro, indipendente e che consenta una adeguata tracciabilità fornisce la possibilità di poter sempre "fare il punto" di ciò che viene fatto e, soprattutto, di come viene fatto consentendo contemporaneamente di fornire a chi di dovere la prova, esistente ex ante, della bontà del nostro procedere tecnico.