



ACCREDIA

L'ENTE ITALIANO DI ACCREDITAMENTO



Salute e Materiali di Riferimento: solide garanzie per nuove esigenze

Torino, 05 ottobre 2021

Dipartimento Laboratori di taratura



L'ENTE ITALIANO DI ACCREDITAMENTO

La qualità delle misurazioni per la diagnosi di Covid-19

Carla Divieto

Ricercatrice INRiM

Torino, 05 ottobre 2021

L'**INRiM** è un **ente pubblico di ricerca scientifica** che svolge per l'Italia le funzioni di **istituto metrologico nazionale**, costituendo il presidio di gran parte della **metrologia, la scienza delle misure**.



L'INRiM realizza, mantiene e sviluppa i **campioni di riferimento nazionali** delle sette unità di base del **Sistema Internazionale (SI)** – **metro, kilogrammo, secondo, ampere, kelvin, mole e candela** – e delle rispettive unità derivate. Attraverso tali campioni garantisce l'affidabilità delle misure a livello nazionale e la loro comparabilità a livello internazionale.

L'attività metrologica fondamentale è sostenuta e affiancata dalla ricerca di base e applicata in numerosi settori: **la scienza dei materiali, le nanoscienze, l'ottica quantistica, lo sviluppo di tecnologie e strumenti di misura innovativi**.



European Metrology Network

Traceability in Laboratory Medicine

«Trace Lab Med»



TRACE LAB MED

Missione

Diventare un'**infrastruttura metrologica europea** coordinata e orientata ai servizi che possa fornire supporto per conferire riferibilità metrologica dei risultati clinici della diagnostica in vitro (IVD), allo scopo di:

- migliorare la **validità e l'affidabilità** dei risultati delle analisi cliniche basate sui test in vitro,
- aumentare la **fiducia** dei cittadini nei risultati di tali analisi,
- migliorare la sicurezza dei **pazienti**,
- sostenere l'**industria europea dell'IVD** nel soddisfare i requisiti normativi
- **allineare** le attività europee nelle sfide globali.

Modalità di azione

- Costruire **collegamenti diretti** con gli **Stakeholder** da cui informazioni sulle esigenze, esperienze e progressi nella valutazione metrologica dei dati;
- Promuovere una **ricerca coordinata** dall'alto verso il basso basata sui requisiti degli Stakeholder;
- **Costruire capacità** per la riferibilità metrologica;
- Stabilire stretti legami con i **laboratori di riferimento europei**.

European Metrology Network

Traceability in Laboratory Medicine

«Trace Lab Med»



TRACE LAB MED

Membri

| Abbreviazione | Nome completo | Paese/Organizzazione |
|----------------------|---|----------------------|
| LNE | Laboratoire national de métrologie et d'essais | France |
| BAM | Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung | Germany |
| PTB | Physikalisch-Technische Bundesanstalt | Germany |
| EXHM/GSCL-EIM | National Laboratory of Chemical Metrology/General Chemical State Laboratory - Hellenic Institute of Metrology | Greece |
| INRIM | Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica | Italy |
| VSL | VSL – National Metrology Institute | Netherlands |
| MIRS/NIB/FITO | Metrology Institute of the Republic of Slovenia/National Institute of Biology/Department of Biotechnology and Systems Biology | Slovenia |
| METAS | Federal Institute of Metrology METAS | Switzerland |
| UME | Ulusal Metroloji Enstitüsü | Turkey |
| LGC | LGC Ltd. | United Kingdom |
| NIBSC | National Institute for Biological Standards and Control | United Kingdom |
| NPL | National Physical Laboratory | United Kingdom |

European Metrology Network Traceability in Laboratory Medicine «Trace Lab Med»



TRACE LAB MED

COVID-19

| | | | | | | |
|--|---|-----------------------------|---|-----------------------|---|------------------------------------|
|  SEARCH | The gateway to Europe's integrated metrology community. | | Home Newsletter Contact us LinkedIn YouTube Twitter | |  | |
|  LOGIN | | | | | | |
|  MENU | ABOUT EURAMET | EUROPEAN METROLOGY NETWORKS | IMPACT, INNOVATION & RESEARCH PROGRAMMES | GUIDES & PUBLICATIONS | KNOWLEDGE TRANSFER & CAPACITY BUILDING | TECHNICAL COMMITTEES & TC PROJECTS |

Traceability in Laboratory Medicine: supporting the COVID-19 response



The coronavirus pandemic has stopped large parts of the world in its tracks. Presently, countries across the globe are experiencing different stages of the wave of the infection, leading to varying levels of lockdown reinstallments and attempts to resume normality.

Importantly, governmental decisions to ease lockdown restrictions are strongly influenced by the **rate of accrual of new infections** for any given population.

Reliable testing results are thus essential to delineate true cases from other non-coronavirus 'flu-like' symptoms - even at the very onset of the infection and for those with just mild symptoms.

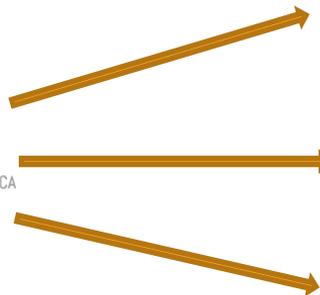
In response to an urgent global need, **healthcare professionals, laboratory medicine specialists and diagnostic assay developers** worldwide have sprung into action - and today a multitude of COVID-19 tests continue to be developed, including those that cater specially for the European market.

Members of EURAMET's Metrology Network for Traceability in Laboratory Medicine (**EMN TraceLabMed**) are key drivers behind these efforts. The network is proud to assist on several levels:

- providing metrological expertise;
- coordinating European proficiency testing schemes;
- providing reference values for common reference materials; and much more.

<https://www.euramet.org/european-metrology-networks/laboratory-medicine/>

Reti Internazionali



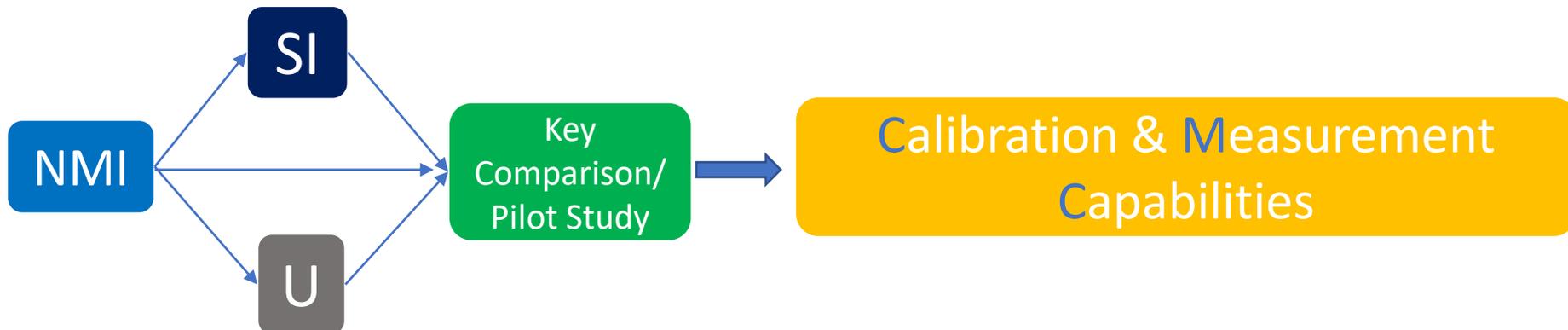
EMN FOR TRACEABILITY IN LABORATORY MEDICINE



CCQM Working Group on Nucleic Acid Analysis (CCQM-NAWG)



CCQM Working Group on Cell Analysis (CCQM-CAWG)



Materiali di riferimento e metodi riferiti al Sistema Internazionale di Unità di Misura (SI):

- **standardizzare metodi di misurazione** applicati alla biologia in ricerca e medicina,
- **valutare** l'efficacia dei **materiali di riferimento**,
- rendere **confrontabili** e armonizzare **i risultati** tra loro.

La diagnosi di COVID-19: dialogo con il clinico

PCR Real Time

- La diagnosi della malattia da COVID-19 si basa principalmente su metodiche quantitative basate sulla PCR Real Time
- La PCR Real Time può dare risultati non affidabili in caso di bassa carica virale
- La PCR Real Time può produrre dei falsi negativi su pazienti positivi alla TC e con sintomi di polmonite



I desiderata

- Tracciamento, ovvero protezione della popolazione più vulnerabile (a domicilio e nei reparti)
- Diagnosi e Intervento precoce (riduzione delle occupazioni delle terapie intensive)
- Quantificazione della carica virale (può essere utile in alcuni contesti)
- **Disponibilità di test più sensibili, specifici e accurati**

| Esame | Risultato | Unità di Misura | Intervallo di riferimento |
|--|---------------------|-----------------|---------------------------|
| Ricerca genomi virus respiratori | | | |
| SARS-CoV-2 | Non rilevato | | |
| <i>Analisi eseguita su tampone naso-faringeo</i> | | | |

Gruppo di lavoro INRIM per la diagnosi del Covid-19

RealTime PCR



BSL
2+

digital PCR



Laboratorio di Metrologia delle Bioscienze



Uncertainty budget - material 2, gene N

| Variable q | statistical | non statistical | parameters | | | | | | | | | |
|------------|-------------|-------------------|------------|---|----------------|-----|----------|--|---------------------|--------------------------------|------------------|------|
| Symbol | Value | note | s | e | k _y | Dof | n sample | v ₁ /y ₁ | q=2x/y ₁ | q ² /y ₁ | u _{rel} | Q1 |
| Df | 4.21 | spike calibration | B.8E-02 | | | 39 | 40 | 1.9E-04 | 3.4E+00 | 0.002 | 6 | 0.3 |
| | | reproducibility | 2.0E-08 | 3 | 1.00 | 1 | 1.2E+02 | 3.4E+00 | 0.15 | 3 | 1.85 | 28.6 |
| IntegN | 0.9974 | reproducibility | 0.001 | | | 8 | 27 | 1.3E-08 | -5.6E+00 | 0.39 | 1 | 47.9 |
| | | repeatability | 0.0004 | | | 18 | 27 | 6.0E-09 | -5.6E+00 | 0.18 | 2 | 22.5 |
| Vd | 7.60E-4 | volume estimation | 5.0E-05 | | | 99 | 100 | 2.5E+11 | -1.9E+04 | 1.01 | 3 | 1.1 |
| | | pin calibration | 1.5E-05 | | | 30 | 1 | 2.3E-10 | -1.9E+04 | 0.08 | 4 | 9.8 |
| C | 14.20 | cp/g | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | Variance, v ₁ /y ₁ | | | 0.82 | |
| | | | | | | | | Standard uncertainty, u(y) | | | 0.91 | |
| | | | | | | | | Dof | | | 31 | |
| | | | | | | | | Confidence level | | | 95% | |
| | | | | | | | | Coverage factor | | | 2.56 | |
| | | | | | | | | Expanded uncertainty (p ₉₅) | | | 1.95 | |
| | | | | | | | | Relative expanded uncertainty (%) | | | 13.00 | |

Droplet Digital PCR - ddPCR



- Altamente sensibile
- Quantificazione assoluta
- Potenziale metodo di riferimento

sample and reaction mix preparation

droplets generation

PCR amplification

droplet reading

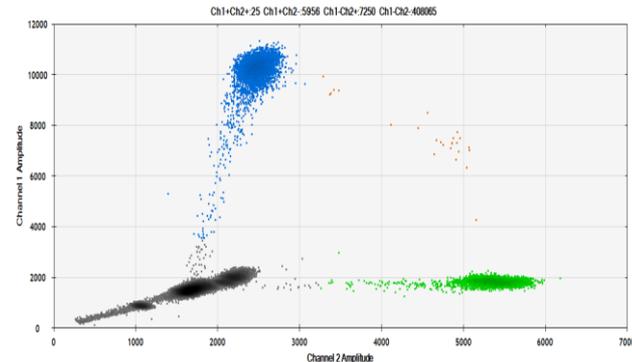
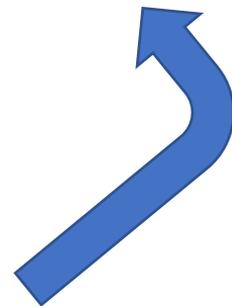
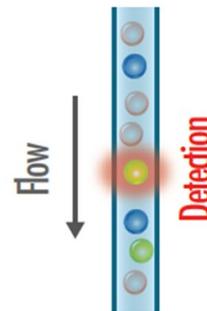
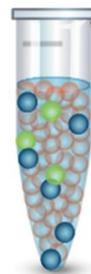
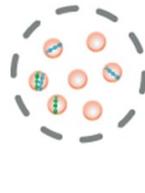
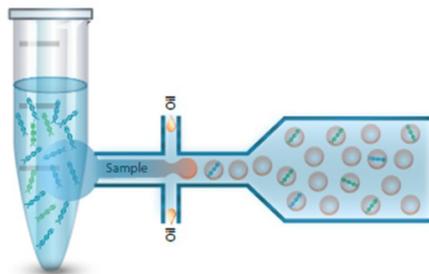
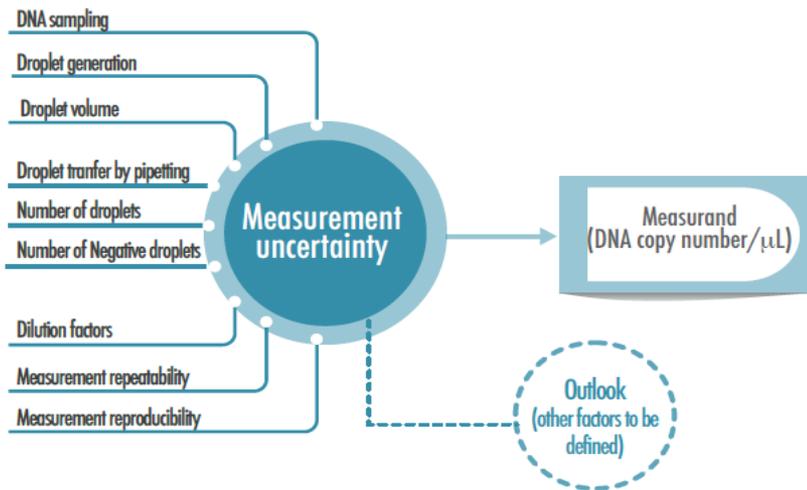


Immagine disegnata da C.Divieto e Studio Makemood

Caratterizzazione Metrologica della ddPCR – primi passi




ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY
 ▶ springer.com

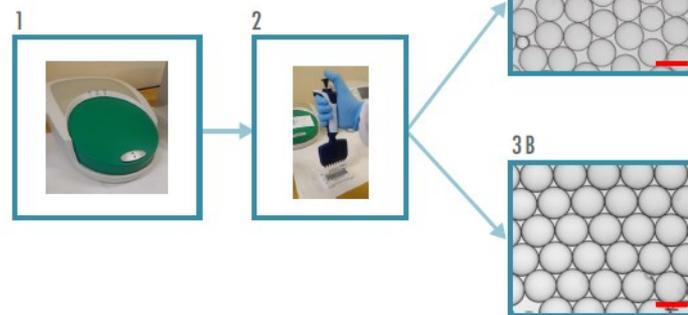
[Anal. Bioanal. Chem.](https://doi.org/10.1007/s00216-017-0625-y) 2017; 409(28): 6689–6697. PMCID: PMC5670190
 Published online 2017 Sep 18. doi: [10.1007/s00216-017-0625-y](https://doi.org/10.1007/s00216-017-0625-y) PMID: 28921124

Droplet volume variability as a critical factor for accuracy of absolute quantification using droplet digital PCR

[Alexandra Bogožalec Košič](#),^{1,2} [Carla Divieto](#),³ [Jernej Pavšič](#),^{1,2} [Stefano Pavarelli](#),³ [David Dobnik](#),¹ [Tanja Dreo](#),¹ [Roberto Bellotti](#),³ [Maria Paola Sassi](#),³ and [Jana Žel](#)¹

| Component (y) | Uncertainty u(y) | | Sensibility coefficient $c_y = \frac{\partial x}{\partial y}$ | Contribution to $u(C_{BRAC, mut})$ $c_y \times u(y)$ |
|---|-----------------------------|-------------------------------|--|---|
| | Source | Standard uncertainty | | |
| D_f | Pipette calibration | 0,268 μL | $-\frac{\ln(\frac{N_{neg}}{N})}{V_d}$ | 1,221 |
| N_{neg} / N | Measurement reproducibility | 24,304 | $\frac{D_f}{(\frac{N_{neg}}{N}) \times V_d}$ | -0,070 |
| V_d | Volume variability* | 6,5x10 ⁻⁶ | $\frac{D_f \times \ln(\frac{N_{neg}}{N})}{V_d^2}$ | -0,164 |
| $u(C_{BRAC, mut}) = \sqrt{(1,221)^2 + (-0,070)^2 + (-0,164)^2}$ | | | | |
| $C_{BRAC, mut}$ [cp/μL] | | $u(C_{BRAC, mut})$ [cp/μL] | $U(C_{BRAC, mut})$ [cp/μL], k=2 | $U(C_{BRAC, mut})$ [%], k=2 |
| 18,22 | | 1,24 | 2,48 | 13,6 |

Real cases of droplet generation and pipetting at Inrim lab.



Immagini realizzate da C.Divieto e Studio Makemood

La diagnosi di COVID-19: la richiesta del clinico

Digital PCR

- Discriminare i falsi negativi dai negativi fornendo **misure accurate** di **Quantificazione della carica virale** del SARS-CoV-2 su campioni di RNA derivante da pazienti Covid
- Valutare in digital PCR dei casi "grigi" (sintomatici ma negative in PCR Real Time)
- Valutare in digital PCR dei casi "indeterminati"



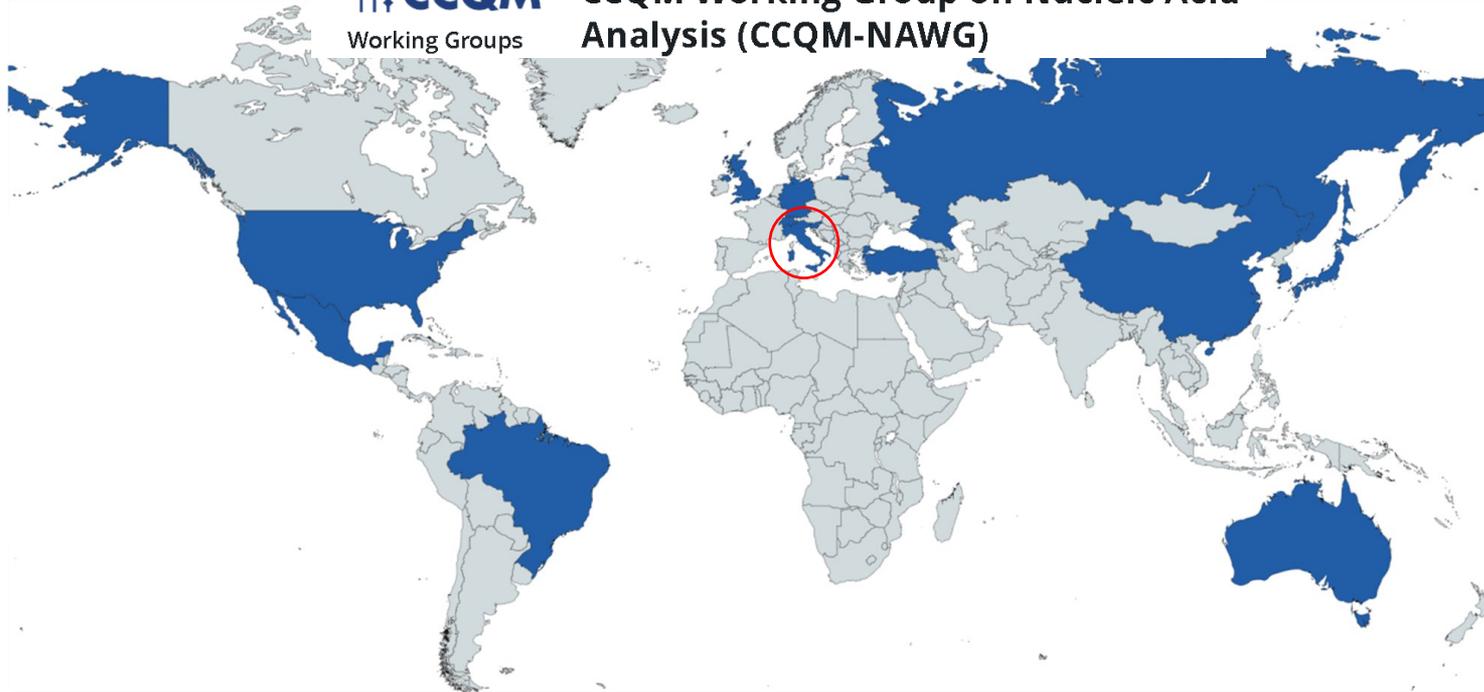
Possibili vantaggi

- Determinare la carica virale presente (e non limitare la risposta a presenza o assenza di genoma virale) è importante nei pazienti ematologici che per le caratteristiche della malattia o dei trattamenti hanno sistemi immunitari compromessi che determinano una più prolungata persistenza del virus (di ostacolo per avviare o proseguire terapie)
- Screening di pazienti a cui deve essere somministrata terapia immunosoppressiva
- Valutazione dei pazienti che non rispondono alla terapia convenzionale, o che presentano un quadro infiammatorio importante, in modo da poter valutare nel tempo l'andamento dell'infezione

Pilot study «SARS-CoV-2 RNA copy number Quantification» (P199b)



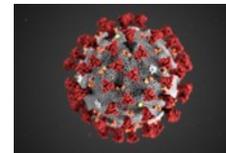
CCQM Working Group on Nucleic Acid Analysis (CCQM-NAWG)



Partecipanti:

21 enti tra NMI, DI e altri enti di ricerca e sviluppo di materiali di riferimento

P199b: obiettivi

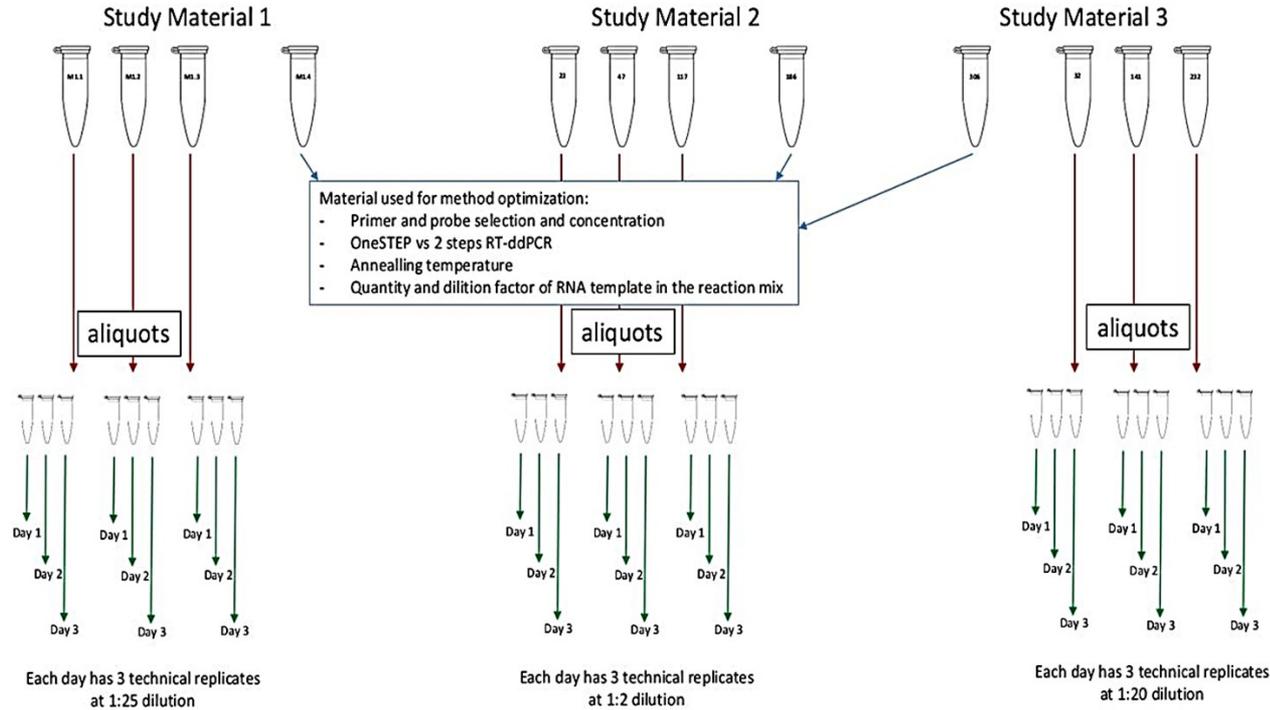
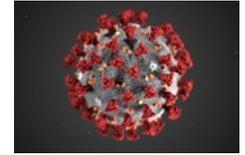


Fornire agli NMI gli strumenti metrologici adeguati per essere in grado di **rispondere alle esigenze nazionali** nella **risposta globale** alla pandemia **COVID-19**:

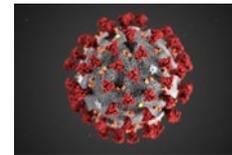
- Avere la **capacità** di assegnare **valori di riferimento** ai **materiali di riferimento** e **taratura**
 - Riuscire ad associare un'**incertezza di misura** ai propri **risultati**
 - Poter supportare la **standardizzazione analitica** dei **metodi diagnostici**
- misurazione della concentrazione del **numero di copie di RNA del SARS-CoV-2 nell'intervallo diagnostico** che va dal limite di rilevamento di **10 copie/ μ L** ad un massimo rilevabile di **10⁴ copie/ μ L** in **matrici rappresentative di RNA umano**

→ MATERIALE DI RIFERIMENTO

P199b: disegno sperimentale



P199b: metodologia

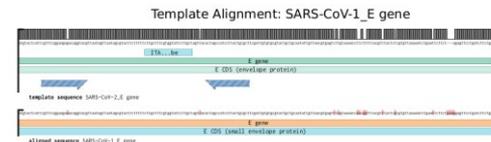


Per sviluppare un nuovo metodo in grado di quantificare il gene N ed il gene E del virus, sono stati selezionati nuovi primer e sonde per i 2 geni:

Domini conservati per evitare inclusioni di basi soggette a mutazioni

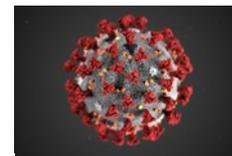


Primer e sonde specifici per SARS-CoV-2, confrontando i genomi di SARS-CoV-2 e SARS-CoV-1



La temperature di melting selezionata a 60°C per evitare legami non specifici o auto complementarietà

P199b: incertezza di misura

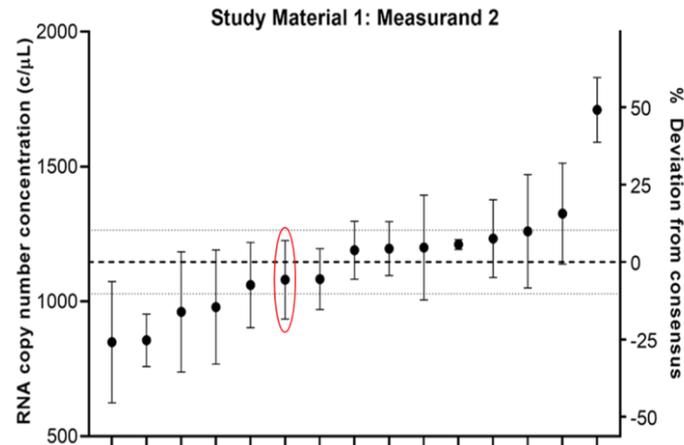
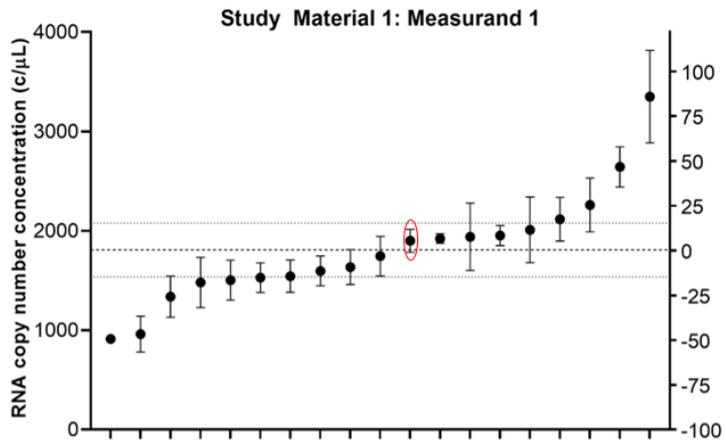
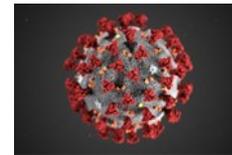


Uncertainty budget – material 2, gene N

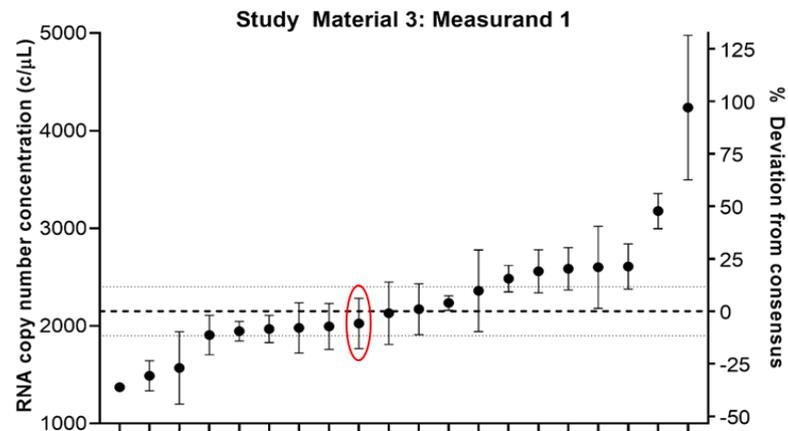
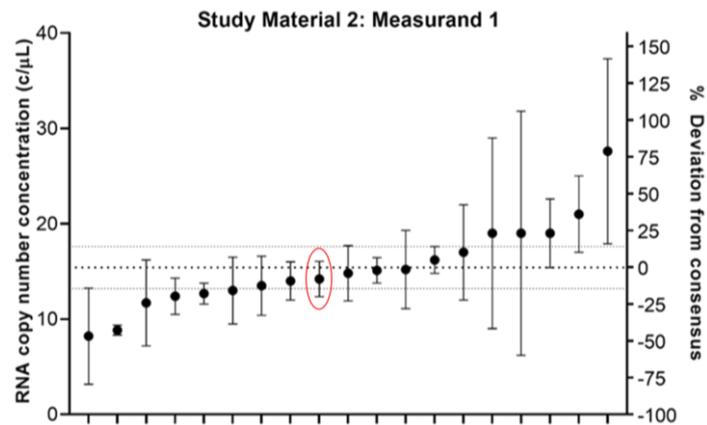
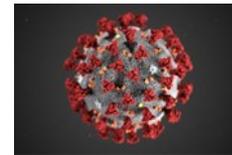
| Variable x_j | | | statistical | non statistical | | parameters | | | | | rank | AI [%] | SI [%] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|---------------------|-------------|-----------------|-----------|------------|-----------------------------------|------------|-----------------|----------|------|--------|--------|-------|--|--|--|--|--------------------|--|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|------------------------------|--|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-----|--|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|------------------|--|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-----------------|--|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|------------------------------|--|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-----------------------------------|--|-------|--|--|--|
| Symbol | Value | note | s_j | σ_j | k_{s_j} | DoF | n sample | $u^2(x_j)$ | $q = Dy_j/Dx_j$ | $u^2(y)$ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Df | 4.21 | pipette calibration | 8.8E-02 | | | 39 | 40 | 1.9E-04 | 3.4E+00 | 0.002 | 6 | 0.3 | 0.6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | resolution | | 2.0E-01 | 3 | 100 | 1 | 1.3E-02 | 3.4E+00 | 0.15 | 3 | 185 | 38.6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nneg/N | 0.9974 | reproducibility | 0.001 | | | 8 | 27 | 1.3E-08 | -5.6E+03 | 0.39 | 1 | 47.9 | 100.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | repeatability | 0.0004 | | | 18 | 27 | 6.0E-09 | -5.6E+03 | 0.18 | 2 | 22.5 | 46.9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Vd | 7.60E-4 | volume estimation | 5.0E-05 | | | 99 | 100 | 2.5E-11 | -1.9E+04 | 0.01 | 5 | 1.1 | 2.2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | pixel calibration | 1.5E-05 | | | 30 | 1 | 2.3E-10 | -1.9E+04 | 0.08 | 4 | 9.8 | 20.6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <tr> <td>C</td> <td>14.20</td> <td>cp/μl</td> <td colspan="4"></td> <td colspan="2">Variance, $u^2(y)$</td> <td colspan="2">0.82</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td colspan="7"></td> <td colspan="2">Standard uncertainty, $u(y)$</td> <td colspan="2">0.91</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td colspan="7"></td> <td colspan="2">DoF</td> <td colspan="2">31</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td colspan="7"></td> <td colspan="2">Confidence level</td> <td colspan="2">95%</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td colspan="7"></td> <td colspan="2">Coverage factor</td> <td colspan="2">2.04</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td colspan="7"></td> <td colspan="2">Expanded uncertainty [cp/μl]</td> <td colspan="2">1.85</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td colspan="7"></td> <td colspan="2">Relative expanded uncertainty [%]</td> <td colspan="2">13.00</td> <td colspan="2"></td> </tr> </table> | | | | | | | | | | | | C | 14.20 | cp/μl | | | | | Variance, $u^2(y)$ | | 0.82 | | | | | | | | | | | Standard uncertainty, $u(y)$ | | 0.91 | | | | | | | | | | | DoF | | 31 | | | | | | | | | | | Confidence level | | 95% | | | | | | | | | | | Coverage factor | | 2.04 | | | | | | | | | | | Expanded uncertainty [cp/μl] | | 1.85 | | | | | | | | | | | Relative expanded uncertainty [%] | | 13.00 | | | |
| C | 14.20 | cp/μl | | | | | Variance, $u^2(y)$ | | 0.82 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | Standard uncertainty, $u(y)$ | | 0.91 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | DoF | | 31 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | Confidence level | | 95% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | Coverage factor | | 2.04 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | Expanded uncertainty [cp/μl] | | 1.85 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | Relative expanded uncertainty [%] | | 13.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

U da 6,10% a 15,64%

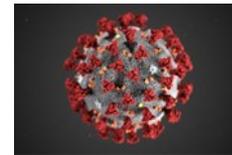
P199b: risultati in grafico - 1



P199b: risultati in grafico - 2



P199b: conclusioni per INRIM



Sviluppato ed ottimizzato un **nuovo metodo** (non già presente sul mercato) basato sulla **ddPCR** per il riconoscimento di sequenze del **gene N** e del **gene E** del **SARS-CoV-2** in concentrazioni medio/basse e molto basse, che, rispettivamente, rappresentano casi di **bassa carica virale** e carica virale talmente bassa da non essere sempre rilevabile mediante la tradizionale PCR Real Time .

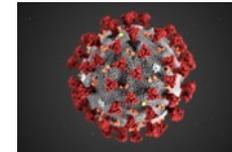
→ Il metodo sviluppato è **specifico per il SARS-CoV-2** e particolarmente **sensibile**

→ efficacia su tamponi «dubbi» in PCR Real Time!

Caratterizzato metrologicamente il metodo in termini di **riproducibilità** e **incertezza** (pari al 15% nei casi peggiori),

Eseguito le analisi sul materiale del confronto riportando i risultati e le relative incertezze associate.

P199b: quantificazione affidabile di SARS-CoV-2



CARICA VIRALE
Copie/ μ L



Stabilità

Omogeneità

Concentrazione

Numero di copie per μ L

Estrazione di RNA
mediante
kit commerciali

Conversione di
RNA in cDNA
mediante
kit commerciali

PCR per analisi
qualitativa e
quantitativa del
virus mediante
kit commerciali

Risultati dell'analisi
quantitativa
espressi in numero
di copie per μ L

Altre applicazioni della metrologia per diagnostica (altri confronti)

