

## Validazione dei metodi quantitativi bioanalitici in spettrometria di massa: regole e protocolli sperimentali

Antonio D'Avolio<sup>1</sup>, Marco Cantù<sup>2</sup>, Jacopo Gervasoni<sup>3</sup>, Carlo Artusi<sup>4</sup>, Mariela Marinova<sup>4</sup>, Antonello Nonnato<sup>5</sup>, Giuliana Cangemi<sup>6</sup>, Silvia Persichilli<sup>3</sup> per il Gruppo di Studio SIBioC - Medicina di Laboratorio "La spettrometria di massa: applicazioni e innovazioni diagnostiche"

<sup>1</sup>Laboratorio di Farmacologia Clinica e di Farmacogenetica, Ospedale Amedeo di Savoia, Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino

<sup>2</sup>Laboratorio di Biochimica e Farmacologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio EOLAB, Ente Ospedaliero Cantonale, Bellinzona, Svizzera

<sup>3</sup>UOC Chimica Clinica, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

<sup>4</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Padova

<sup>5</sup>Unità di Biochimica Clinica, Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Città della Salute e della Scienza", Torino

<sup>6</sup>Laboratorio di Patologia Clinica, Istituto Giannina Gaslini, Genova

### ABSTRACT

**Bioanalytical method validation of quantitative mass spectrometry based assay: experimental protocols and regulations.** Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) technique has rapidly extended the spectrum of clinical chemistry methods during the past decade and it has become a standard tool for endogenous and exogenous substances in research laboratories as well as in many clinical laboratories. To date, many guidelines for bioanalytical method validation have been published, but there is still the need to have specific guidelines and experimental protocols. In particular, we need to further focus and investigate the overall clinical aspects of spectrometry method validation, for both exogenous and endogenous molecules. The aim of the present document is to suggest specific experimental regulations and protocols for bioanalytical LC-MS method validation for exogenous and endogenous molecules, inspired by actual international guidelines and integrated with practical tips to obtain better performance on methods used in routine clinical practice. Here we have introduced new concepts such as "normalized matrix effect", and protocols for method validation using "pathological samples" and "altered samples", as these are the most commonly samples encountered in laboratory routine. In conclusion, the new rules and protocols reported in this work do not intend to replace international guidelines; we believe that these rules have to be considered besides the available guidelines with the aim to help the LC-MS users by recommending a number of experimental steps to be performed during each method/kit validation.

### INTRODUZIONE

Nell'ultima decade la cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa (LC-MS) e maggiormente la spettrometria di massa accoppiata (LC-MS/MS, in seguito denominata come LC-MS) ha rapidamente esteso lo spettro dei metodi impiegati nelle indagini di chimica clinica ed è diventata uno strumento di riferimento per la quantificazione delle sostanze endogene ed esogene nei laboratori di ricerca così come

in molti laboratori clinici.

Sebbene la LC-MS abbia caratteristiche tali da suggerire un'alta accuratezza analitica, sono state recentemente identificate potenziali fonti di inaccuratezza e di bias (1). Queste possono essere correlate ad esempio al processo di ionizzazione nella sorgente con trasformazione di metaboliti coniugati in analiti oggetto della quantificazione, oppure possono essere attribuite ad effetti matrice che producono processi di ionizzazione diversi tra gli analiti di interesse

Corrispondenza a: Antonio D'Avolio, Laboratorio di Farmacologia Clinica e di Farmacogenetica, Dipartimento di Scienze Mediche, Ospedale Amedeo di Savoia, Corso Svizzera 164, 10149 Torino. Tel. 0114393841, Fax 0114393996, E-mail: antonio.davolio@unito.it

Ricevuto: 06.09.2017

Revisionato: 07.11.2017

Accettato: 17.11.2017

Pubblicato on-line: 19.01.2018

DOI: 10.19186/BC\_2018.004

e gli standard interni (IS) (1). Il diverso effetto della ionizzazione delle molecole da quantificare rispetto allo IS può essere così marcato da rendere inaccurato il dato quantitativo e deve essere attentamente valutato soprattutto nel caso dell'impiego di standard interni non isotopicamente modificati. Inoltre l'inaccuratezza può essere associata anche con il processo di selezione degli ioni target di quantificazione nel caso in cui nella matrice vi siano delle molecole, diverse da quelle da quantificare, che frammentano nello stesso modo degli ioni target. Nella maggior parte dei casi la maggior fonte di inaccuratezza può essere eliminata e/o controllata da una purificazione del campione biologico, ad esempio mediante estrazione in fase solida, e da uno studio puntuale e attento, ottimizzando le condizioni separative cromatografiche.

La preparazione dei campioni, la scelta della separazione cromatografica ottimale e quindi la scelta della colonna cromatografica, delle condizioni di flusso, di gradiente oltre a tutti i parametri richiesti dalle linee guida internazionali (2-5), sono punti critici nel processo di validazione di un metodo bioanalitico in LC-MS, specialmente quando è utilizzato in una routine clinica. Il recente dibattito sull'inaccuratezza dei risultati della 25-OH-vitamina D ottenuti con LC-MS, ha messo in evidenza il bisogno di una maggiore standardizzazione dei metodi anche in spettrometria di massa per ottenere un risultato di qualità soddisfacente per l'uso clinico dei risultati. La garanzia di qualità è un traguardo imprescindibile per qualsiasi applicazione analitica e soprattutto nell'applicazione clinica dei metodi LC-MS sviluppati in casa dove è richiesta una validazione completa; ciò anche alla luce della nuova regolamentazione (6) e del fatto che non sono molti i kit LC-MS diagnostici *in vitro* (IVD) presenti sul mercato.

Ad oggi, sono state pubblicate numerose linee guida per la validazione dei metodi bioanalitici ma c'è ancora la necessità di avere specifiche linee guida e protocolli sperimentali per le metodiche di LC-MS, soprattutto sullo studio dell'effetto matrice, e sull'impatto dei campioni patologici sulle caratteristiche di qualità del metodo (come ad esempio campioni lipemici, iperbilirubinemici). In particolare, è necessario indagare ulteriormente sull'aspetto clinico della validazione del metodo LC-MS, sia per le molecole esogene che endogene; pertanto, ogni metodo dovrebbe essere sottoposto a una rigorosa e sistematica validazione clinica al fine di garantire risultati e cure efficaci ai pazienti.

Il presente documento trae origine dalle considerazioni contenute nelle linee guida internazionali (2-5) e amplia il percorso di validazione con la valutazione dell'effetto matrice normalizzato (7). Inoltre lo scopo del documento del gruppo di studio di SIBioC è quello di suggerire delle regole e un protocollo di validazione dei metodi bioanalitici in LC-MS [riferibili in particolare alle linee guida Food and Drug Administration (FDA) ed European Medicines Agency (EMA)] applicabili per la quantificazione di componenti sia endogeni che esogeni, studiando l'effetto matrice in campioni patologici e in campioni alterati.

## VALIDAZIONE DEL METODO BIOANALITICO

### Validazione completa

Come indicato nelle linee guida, ogni metodo analitico, sia nuovo o basato sulla letteratura (2-5) deve essere validato completamente, in particolar modo per metodi usati nella pratica clinica (1). Lo scopo della validazione è quello di dimostrare l'affidabilità di un metodo nella determinazione della concentrazione di un analita (o di più analiti) in una matrice biologica specifica, come il sangue, il plasma, il siero, le urine, il fluido cerebrospinale o la saliva, considerando anche i nuovi sistemi di campionamento quali quelli su carta o filtro, come i "dried blood spots" (DBS) e i "dried plasma spots" (DPS) (3, 8-12). Inoltre, se i campioni vengono raccolti con un anticoagulante, la validazione deve essere effettuata usando lo stesso anticoagulante presente nei campioni dello studio. Generalmente, una validazione completa dovrebbe essere effettuata per ciascun tipo di specie e di matrice considerate (2).

Tutti i passaggi necessari per una completa validazione dei metodi bioanalitici devono fare riferimento alle attuali linee guida internazionali (2-4), tuttavia, queste devono essere riesaminate e rimodulate a causa delle caratteristiche intrinseche della tecnologia LC-MS.

### Selettività

La selettività o specificità di un metodo potrebbe essere influenzata dalla presenza di analiti e/o metaboliti interferenti, dal protocollo seguito per la preparazione del campione e dal metodo strumentale utilizzato come ad esempio la separazione cromatografica, e/o il "cross-talk". Il metodo cromatografico deve essere in grado di differenziare nella matrice biologica sia gli analiti d'interesse sia lo IS dai composti endogeni o da altri componenti presenti nel campione del paziente (2). La selettività deve essere provata analizzando almeno 6 diverse matrici bianche o surrogate "neat" (per la quantificazione di composti endogeni), le quali devono essere analizzate individualmente, verificando l'assenza di potenziali interferenti. Se vengono analizzate delle molecole esogene, possono essere usati 6 campioni di pazienti che non contengono la molecola d'interesse. In campo clinico, al fine di valutare i principali contaminanti dei prelievi ematici, suggeriamo di usare anche almeno due matrici iperlipidemiche e almeno due matrici emolizzate. Inoltre, devono anche essere considerati i principali contaminanti che potrebbero essere presenti nella popolazione dello studio (come ad esempio popolazioni soggette a ittero). Solo in caso di uso di matrici rare (quali essudati, fluido cerebrospinale, tessuti solidi) e per applicazioni non routinarie (per ricerca) il numero di tali prove può essere ridotto, anche se non è consigliabile farlo. Generalmente, l'assenza di interferenti è accettata quando la risposta per gli analiti è al di sotto del 20% del limite inferiore di quantificazione (LLOQ) e del 5% per lo IS, come riportato nelle linee guida (2). Queste regole andrebbero applicate a tutti i seguenti

problemi di validazione specifica.

*Valutazione delle interferenze tra IS marcati con isotopi stabili e analiti.* Si suggerisce di fare riferimento alle linee guida dell'EMA per questo sotto-paragrafo (2). Per ciascun analita analizzato nel metodo, la procedura dovrebbe essere effettuata in almeno tre replicati per ogni matrice fortificata analizzata. Tuttavia, la specificità per tutti gli analiti (inclusi gli standard interni) deve essere verificata.

*Valutazione delle interferenze date da altri analiti e/o metaboliti, comunemente riscontrabili nella matrice.* Come richiesto nelle linee guida, per tutti i metodi è necessario valutare quali tra i possibili analiti che potrebbero interferire con gli analiti d'interesse, possono essere riscontrati nei campioni dei pazienti. Ad esempio, un metodo sviluppato per quantificare farmaci antiretrovirali nel plasma deve tener conto di tutti i farmaci co-somministrati, dei metaboliti e di tutti i composti con una struttura chimica simile che potrebbero interferire con l'analisi (13, 14).

Anche per le procedure considerate in questo sottocapitolo è opportuno fare riferimento alle attuali linee guida EMA (2). Per questo argomento, l'uso di campioni reali (almeno 30) da pazienti è cruciale. In particolar modo, se consideriamo i farmaci, campioni con differenti tempi di campionamento (con orari differenti rispetto all'ultima assunzione del farmaco da parte del paziente) dovrebbero essere analizzati: almeno 15 campioni con concentrazioni basse (C<sub>min</sub> o C<sub>trough</sub>) e almeno 15 campioni con concentrazioni alte (C<sub>max</sub>). Questi risultati dovrebbero sempre essere analizzati facendo riferimento ai dati clinici disponibili.

Potrebbe essere anche necessario valutare l'esistenza di qualche interferenza causata da:

- Metaboliti conosciuti del farmaco(i) e di composti isobari (1); deve essere studiata la possibilità di modifiche dei metaboliti o di altre molecole in composti isobari dell'analita. Speciale attenzione deve essere riservata ai metaboliti instabili (quali per esempio metaboliti acidi, esteri idrossili, N-ossidi o metaboliti glucuronati,) che possono modificare le loro strutture durante la preparazione e analisi in massa dei campioni (procedure estrattive e/o decadimento nella sorgente) trasformandoli in composti isobari dell'analita.
- Interferenze date da prodotti di degradazione generati durante la preparazione dei campioni (1); nel caso di preparazioni complesse (che richiedono ad esempio idrolisi o derivatizzazioni) è necessario valutare la presenza o l'assenza di picchi interferenti derivati dal trattamento del campione. Questa valutazione può essere fatta analizzando almeno sei differenti campioni ottenuti da pazienti reali. Se i picchi interferenti hanno dei tempi di ritenzione vicini a quelli dell'analita(i) e/o dello/degli IS, devono essere separati cromatograficamente, oppure i metodi devono essere ottimizzati al fine di effettuare questa totale separazione.

Per le molecole esogene, se si viene a conoscenza della presenza di isomeri (in particolare di isomeri con una

attività farmacologica differente), la separazione cromatografica dovrebbe essere totale (o almeno parziale) (15). Per verificare le interferenze durante le analisi di campioni reali, la valutazione di transizioni di massa multiple, assieme al rapporto delle loro intensità relative, permette di discriminare gli analiti target da tutte le possibili interferenze.

### Carry-over

Il fenomeno del carry-over deve essere studiato attentamente e minimizzato durante lo sviluppo di un metodo LC-MS, prima ancora della validazione. Durante la validazione il carry-over dovrebbe essere valutato iniettando campioni bianchi (o neat, per gli analiti endogeni) dopo il calibratore a più alta concentrazione di analita o dopo un campione con una concentrazione vicina al limite di quantificazione più alto (ULOQ) (2). La più alta concentrazione di analita alla quale non si osserva il carry-over [sopra il limite di rilevabilità (LOD) del metodo] è considerata la concentrazione alla quale il metodo non è influenzato da carry-over. Questa concentrazione deve essere valutata in tripla analisi. Come riportato dalle linee guida, il carry-over nel bianco (o nel neat) dopo un campione ad alta concentrazione non deve essere maggiore del 20% del LLOQ e del 5% per l'IS (2).

Se possibile, la procedura analitica deve essere modificata per rimuovere ogni carry-over, quando presente. Quando non vi è questa possibilità, le procedure devono riportare come affrontare il carry-over (per esempio, il segnale deve essere 10 volte più grande del segnale in un bianco che precede immediatamente il campione oppure questo deve essere analizzato od estratto nuovamente). Tuttavia, se il carry-over risulta inevitabile, è necessario fare riferimento alle attuali linee guida per decidere come comportarsi: per esempio, verifiche specifiche possono essere considerate e testate durante la validazione, e applicate durante le analisi dei campioni dei pazienti, in modo da non influenzare l'accuratezza e la precisione (2). Questo può includere iniezioni nel sistema LC-MS di fasi mobili o di bianchi (o di neat) dopo i campioni che si pensa possano avere una elevata concentrazione e prima dell'iniezione del successivo campione (2).

### Limite inferiore di quantificazione

Il LLOQ rappresenta la più bassa concentrazione di analita, misurata su 40 replicati per almeno 5 sedute analitiche (come indicato nelle ultime linee guida) che fornisce un picco identificabile con una precisione del 20% e un'inaccuratezza del 15%. Il LOQ dovrebbe essere utilizzato come punto più basso della curva di calibrazione (2).

*Procedura suggerita per la determinazione di LOQ e LLOQ per le molecole esogene.* Aggiungere quantità scalari di standard analitico a una matrice liofilizzata, se disponibile in commercio. Se non è disponibile utilizzare 6 matrici diverse provenienti da 6 diversi soggetti.

*Procedura suggerita per la determinazione di LOQ e LLOQ per le molecole endogene.*

- Aggiungere quantità scalari di standard analitico a una matrice surrogata, se disponibile, ed effettuare le misure come descritto sopra.
- Se le curve di calibrazione sono state costruite con il metodo della calibrazione con doppia marcatura aggiungere quantità scalari dell'analita Dx (contenente x deuteri) alla matrice e effettuare le misure come descritto sopra.

### *Curva di calibrazione*

Per ogni analita studiato ci deve essere una curva di calibrazione che copra un intervallo di valori clinicamente significativo. Gli standard di calibrazione possono contenere più di un analita. La risposta (segnale, area/altezza del picco) dello strumento in relazione alla concentrazione di analita deve essere valutata e descritta adeguatamente nell'intervallo di concentrazione specificato (2-5).

La curva deve essere preparata utilizzando un minimo di 6 livelli di concentrazione. Il LLOQ dovrebbe essere usato come primo punto della curva. Nel caso in cui la sensibilità del metodo permetta di avere un LLOQ basso, molto al di sotto del valore di interesse clinico, si può utilizzare un primo punto di calibrazione con valore più alto del LLOQ. Nella curva deve essere presente il calibratore zero (non utilizzato solitamente per costruire la curva) ovvero la matrice priva dell'analita, ma contenente lo IS. La curva di calibrazione dovrebbe essere inserita all'inizio di ciascuna seduta analitica (eventualmente anche alla fine per metodi e/o sessioni di analisi molto lunghe). E' possibile un'eccezione a questa regola solo se il laboratorio può dimostrare di ottenere gli stessi risultati con una diminuzione della frequenza di calibrazione, ma non è consigliabile.

L'equazione generalmente che meglio descrive la curva di calibrazione è di tipo lineare. Per ogni curva di calibrazione con un'equazione:  $Y = bX + a$ , si raccomanda di valutare  $R^2$  (ideale  $> 0,995$ ), pendenza e intercetta. Inoltre si raccomanda di valutare l'inaccuratezza dei calibratori confrontando i valori ottenuti per ogni punto (estrapolati dalla curva) con i valori teorici; la differenza non deve essere superiore al 15% tranne che per il LOQ per il quale può essere del 20%. Questo criterio deve essere soddisfatto da almeno il 75% dei punti di calibrazione se la curva è processata una sola volta e dal 50% dei punti di calibrazione se la curva è processata due volte durante la seduta analitica (2).

Il materiale utilizzato per la preparazione delle curve di calibrazione deve essere del massimo grado di purezza disponibile. I calibratori possono essere acquistati se commercialmente disponibili, oppure preparati dal laboratorio. Quando è possibile si raccomanda di utilizzare "Certified reference materials" (CRM) (sciolti in matrice o anche in solvente) per validare i calibratori utilizzati, in quanto il valore dei CRM è assegnato mediante metodi di riferimento. Le curve di

calibrazione dovrebbero essere preparate aggiungendo quantità note di standard alla stessa matrice utilizzata per l'analisi. E' preferibile usare matrici provenienti da almeno 6 soggetti diversi ad eccezione dei calibratori preparati in matrici rare. Le curve di calibrazione possono essere congelate se si dimostra che l'analita è stabile mediante studi appropriati di stabilità (2-5). Nel caso di molecole endogene è possibile utilizzare diversi approcci in base alla disponibilità di materiali in commercio: se sono disponibili in commercio, si raccomanda di utilizzare curve di calibrazione certificate preparate in matrice; se non sono disponibili standard commerciali, aggiungere quantità note di standard a una matrice surrogata.

*Calibrazione con doppia marcatura.* Se disponibili standard con diverso numero di isotopi (es Dx/Dy con  $x \geq 3$  e  $y-x \geq 3$ ), preparare la curva di calibrazione aggiungendo quantità note di standard Dx (contenente x deuteri, ad esempio) alla matrice e utilizzare lo standard Dy come IS. Nel caso non fosse possibile preparare una matrice surrogata con le caratteristiche necessarie, è possibile preparare le curve di calibrazione in solvente dopo averle accuratamente confrontate con quelle preparate in matrice eseguite con il metodo delle aggiunte. La differenza delle pendenze e delle intercette deve essere inferiore al 5%.

*Sensibilità.* La sensibilità (capacità discriminare tra l'intensità di due segnali di campioni a concentrazione diversa) in cromatografia può essere confusa con il LOD, ovvero la concentrazione alla quale il rivelatore restituisce un segnale dell'analita almeno 5 volte superiore il segnale di base di un campione bianco o pulito. Nelle ultime linee guida FDA del 2013 la sensibilità viene definita come "la concentrazione minima di analita che può essere misurata con precisione e accuratezza accettabili (precisamente il LLOQ)" (3).

### *Accuratezza ed esattezza*

L'esattezza o inesattezza (bias) rappresenta il grado di concordanza tra il valore medio ottenuto a partire da diverse determinazioni dello stesso misurando e un valore di riferimento accettato (detto anche valore vero del misurando). Viene espressa come bias che è lo scostamento sistematico rispetto al valore vero (la differenza tra il valore ottenuto e il valore vero) che può quindi essere positivo oppure negativo. L'esattezza non deve essere considerata un sinonimo dell'accuratezza, termine che attualmente viene utilizzato per indicare il grado di concordanza fra il risultato di una singola misurazione e il valore vero del misurando, e questo viene espresso come errore totale della misura (5). L'esattezza dipenderà da quanto accurata è la scelta dei materiali di calibrazione, la loro concentrazione e soprattutto dalla scelta della matrice che deve essere il più possibile commutabile con quella dei campioni reali. È preferibile utilizzare calibratori tracciabili con un grado di incertezza definito.

L'esattezza può essere valutata come bias

utilizzando un materiale di riferimento certificato [come ad esempio i materiali certificati del National Institute of Standards & Technology (NIST)] oppure, se non disponibile, con materiali provenienti da valutazioni esterne di qualità che hanno un valore target assegnato con un metodo di riferimento standard. Qualora questi materiali certificati non siano disponibili, dovrà essere valutato il recupero percentuale mediante aggiunta degli analiti di interesse su campioni di bianco (matrice senza la presenza dell'analita) oppure in caso di sostanze endogene, per cui la matrice priva di analita non è disponibile, è preferibile utilizzare campioni reali o materiali di controllo di qualità (QC). Il recupero, parametro che indica la quantità di analita determinata da un metodo di analisi rispetto alla quantità totale, viene espresso come percentuale del rapporto tra la concentrazione aggiunta (nella fase di valutazione dello stesso) rispetto a quella misurata. La differenza tra il recupero ottimale (100%) e il valore ottenuto determina il valore di bias% da utilizzare per valutare l'esattezza del metodo.

Utilizzare più di un approccio è decisamente raccomandato, in modo tale da assicurare una valutazione più accurata e completa possibile dell'esattezza.

L'esattezza deve essere valutata analizzando per almeno cinque misurazioni replicate in almeno tre differenti sedute analitiche per concentrazione, utilizzando almeno tre campioni a concentrazioni clinicamente rilevanti tali da coprire l'intero intervallo di calibrazione del metodo. L'esattezza così misurata viene valutata come bias percentuale con la seguente formula:

$$\text{Bias\%} = \frac{(\text{valore medio delle misurazioni} - \text{valore vero})}{\text{valore vero}} \times 100$$

Un approccio alternativo, ma ugualmente valido, per la valutazione dell'esattezza è la comparazione con un metodo di riferimento, oppure con un metodo universalmente riconosciuto a maggior livello di standardizzazione. Devono essere utilizzati almeno 40 campioni di pazienti che coprano l'intero intervallo di misurazione e deve essere valutato lo scostamento medio in termini di bias percentuale. Una comparazione con un metodo privo delle caratteristiche di standardizzazione sopra citate non può essere utilizzato per valutare l'esattezza ma semplicemente per definire la correlazione tra due metodi analitici. Il bias% per ogni livello di concentrazione non deve essere superiore al 15%, ad eccezione dell'esattezza al valore di LLOQ che non deve essere superiore al 20%. Questi valori di accettabilità possono essere non validi qualora esistano documenti riconosciuti validi come linee guida locali o regionali o specifiche per una determinata classe di sostanza (ad esempio per i farmaci) oppure da criteri universalmente riconosciuti basati sulla variabilità biologica.

Da ricordare comunque che l'accuratezza è la contemporanea sussistenza di esattezza e precisione, come definito in statistica.

### Precisione

La precisione o imprecisione di un metodo analitico è definita come il grado di concordanza fra misurazioni indipendenti di concentrazione di un'analita e deve includere tutto il processo di analisi, dalla raccolta del campione e conservazione, alla preparazione (estrazione e purificazione) fino all'analisi strumentale (2-5). Per una valutazione adeguata della precisione devono essere preparate e conservate, nelle stesse e opportune condizioni (è essenziale verificare prima la stabilità dell'analita), più aliquote di una sufficiente quantità omogenea della matrice biologica utilizzata. Possono essere utilizzati, se disponibili commercialmente, materiali di controllo a più livelli di concentrazione. Sarà importante verificare che tra i materiali di controllo e i campioni dei pazienti non esistano delle discrepanze di matrice (è essenziale valutare prima l'effetto matrice). In alternativa, o meglio anche contestualmente, è preferibile utilizzare dei pool di diversi campioni di pazienti rispetto ai campioni singoli. La concentrazione dei materiali da valutare deve essere scelta in maniera tale da coprire l'intero intervallo di misurazione e, se previsto, deve includere un valore soglia o di decisione clinica. Nel caso non si riesca a ottenere dei pool a elevate concentrazioni si può effettuare una aggiunta di standard puro ("spiking"; il campione così trattato viene definito "spiked"). La precisione deve essere valutata per un minimo di tre livelli di concentrazione (basso, medio ed elevato). Qualora si utilizzassero materiali di controllo commerciali è necessario valutare la precisione anche per almeno un pool di campioni per verificare l'effettiva commutabilità della matrice.

La precisione deve essere valutata con almeno 10 misurazioni indipendenti per ogni livello di concentrazione e viene espressa come coefficiente di variazione percentuale con la seguente formula:

$$\%CV = \frac{DS \text{ della Media} \times 100}{\text{Media}}$$

La precisione deve essere valutata sia nella stessa seduta analitica (precisione nella serie o ripetibilità) che tra sedute analitiche diverse (precisione tra le serie o precisione intermedia). Quest'ultima è una valutazione della precisione nel tempo, ed è consigliato utilizzare operatori, calibratori, reagenti differenti entro un arco temporale che non deve eccedere i 30 giorni per minimizzare gli effetti dovuti ad altre variabili nelle condizioni sperimentali. Per i campioni con una concentrazione pari ai tre controlli di qualità (alto, medio e basso), il CV non deve essere superiore al 15%; per i campioni con una concentrazione pari al LLOQ, il CV non deve essere superiore al 20% (2, 3). Valori superiori di imprecisione possono essere accettati o valori di imprecisione inferiore devono essere rispettati, qualora esistano documenti riconosciuti validi come linee guida locali o regionali o specifiche per una determinata classe di sostanza (ad esempio i farmaci) oppure da criteri universalmente riconosciuti basati sulla variabilità biologica.

### Recupero

L'elevato recupero dell'analita dalla matrice è un risultato desiderabile della preparazione del campione, ed è quindi una caratteristica importante della procedura di estrazione (2, 3). La valutazione del recupero è suddivisa in recupero assoluto, relativo e recupero dell'estrazione.

Il recupero assoluto è il rapporto percentuale della risposta del rivelatore ottenuto da un campione di matrice bianca fortificata con l'analita, trattata seguendo l'intera procedura analitica, e un campione standard pulito e direttamente iniettato nello strumento, che rappresenta il recupero del 100%. Quando non è disponibile una matrice bianca, si consiglia di utilizzare almeno 6 campioni con bassa concentrazione di analita misurata prima della procedura di recupero.

*Recupero assoluto = [risposta dell'analita inserita in campione bianco (processato) / risposta dell'analita dello standard pulito (non processato)]\*100*

Il recupero relativo è il rapporto percentuale della risposta del rivelatore ottenuto da un campione in bianco con l'aggiunta dell'analita e un campione standard pulito, entrambi trattati secondo l'intera procedura analitica.

*Recupero relativo = [risposta dell'analita inserita in campione in bianco (elaborato) / risposta dell'analita di standard ordinato (elaborato)]\*100*

Per entrambi, il recupero dell'analita non deve essere necessariamente al 100%, i criteri di accettazione sono soddisfatti quando i risultati sono tra 90-110%. Il recupero dell'estrazione è il rapporto percentuale della risposta del rivelatore ottenuta da un campione di matrice vuota fortificata con l'analita prima del trattamento e lo stesso campione in bianco fortificato con l'analita, alla stessa concentrazione nominale, dopo essere stato trattato secondo l'intera procedura analitica.

*Recupero dell'estrazione = [risposta dell'analita "spiked" prima dell'estrazione (processato) / risposta dell'analita "spiked" dopo l'estrazione]\*100*

Il recupero dell'estrazione di un analita e del suo IS devono essere coerenti e riproducibili (criteri di accettazione 60-140%), possibilmente con un errore standard relativo inferiore al 10%. Una percentuale minore e più elevata di recupero (<60% e >140%) potrebbe essere accettata solo se l'errore standard relativo fosse inferiore al 5% per entrambi (analita e IS), indicando un'elevata riproducibilità e robustezza del metodo. Un recupero <60% e >140% deve comunque essere valutato attentamente e giustificato.

Per valutare se le perdite di analita nell'estrazione sono dovute a effetti matrice o realmente a scarsa estrazione, tutti gli esperimenti di recupero dovrebbero essere eseguiti durante lo sviluppo del metodo. Gli esperimenti relativi al recupero dovrebbero essere

effettuati e determinati per almeno 6 campioni di pazienti o 6 diversi lotti di matrice commerciale, per almeno 10 determinazioni nell'intervallo delle concentrazioni previste, utilizzando anche matrici bianche con lipidi e matrici emolizzate, o campioni di pazienti. In particolare, l'aggiunta di concentrazioni note di analiti deve essere eseguita e valutata (come avviene per valutare il recupero) con i campioni bianchi e per i pazienti con iperlipidemia o emolisi. Quando non è disponibile un campione bianco (per analiti endogeni) si dovrebbe utilizzare una matrice alternativa; ad esempio una matrice trattata appositamente o matrice surrogata (ad esempio siero bovino o umano in tampone fosfato).

### Test della integrità della diluizione

In alcuni casi può essere necessario diluire il campione: per esempio quando si ha una concentrazione sopra il punto più alto di calibrazione (oppure al di sopra dell'ULOQ) o quando sono disponibili solo piccole quantità di campione oppure dopo la preparazione del campione per adattarsi alle condizioni cromatografiche (ad esempio un loop nell'autocampionatore, o saturazioni della colonna).

La valutazione della integrità della diluizione deve far parte della validazione parziale (2, 3). Inoltre, visto che la diluizione del campione può influenzare l'accuratezza, il bias e la precisione, l'effetto della diluizione deve essere valutato durante la validazione (2, 3). La diluizione dei campioni estratti deve essere una parte di un metodo validato. L'inaccuratezza e il bias che ne derivano devono essere al di sotto del 15%. Se la validazione della diluizione non viene valutata, i campioni con concentrazioni al di sopra del più alto punto della curva di calibrazione, devono essere riportati in referto come "al di sopra del punto di calibrazione più elevato" o come "maggiore di ULOQ".

### Effetto matrice

L'effetto matrice (ME) è uno dei più importanti parametri da investigare durante lo sviluppo di un metodo in spettrometria di massa; tale effetto può dare origine a una soppressione o, più raramente, a un incremento del segnale (16). L'effetto matrice è collegato all'eluizione di componenti della matrice del campione in analisi, quali i fosfolipidi, gli acidi organici, i sali, capaci di influenzare lo stato di carica all'interno della sorgente ionica. Questo effetto può condizionare parametri quali il LOD, il LOQ, la precisione e l'accuratezza del metodo. Per questo motivo, l'effetto matrice di un metodo dovrebbe essere entro  $\pm 20\%$ ; in caso contrario il laboratorio deve valutare il suo impatto sugli altri parametri di validazione. Se il ME supera  $\pm 20\%$ , potrebbero essere necessarie modifiche al metodo cromatografico e/o alla preparazione del campione e/o all'IS.

I campioni utilizzati per lo studio del ME devono rispecchiare la tipologia di campioni per cui il metodo è stato sviluppato, partendo dalle medesime matrici

biologiche (plasma, sangue intero, saliva, urine, biopsie, campioni *post mortem*); devono poi essere valutate specifiche condizioni clinico/patologiche (campioni iperlipemici, presenza di disfunzioni metaboliche). Nel caso di matrici derivanti da sangue (sangue intero, plasma, siero) è altamente consigliata la valutazione del ME dei principali contaminanti (inclusi emolisi, iperlipidemia, iperbilirubinemia). Ogni valutazione sul ME deve essere effettuata utilizzando lo stesso tipo di provetta utilizzata per il prelievo (con il medesimo anticoagulante) che verrà utilizzata in fase di campionamento. Nel caso in cui si vogliano utilizzare più tipi di provette, bisogna effettuare la valutazione del ME per ogni tipo di agente anticoagulante o additivo presente nelle provette da prelievo che si vogliono validare. L'effetto matrice deve essere studiato al fine di poter ipotizzare e/o identificare la sua origine, specialmente per gli effetti matrice positivi. Se l'ME è difficile da eliminare, in quanto generato da fattori intrinseci, quali il pH, o la presenza di sali, il laboratorio deve verificarne l'impatto su LLOQ, precisione e accuratezza e dichiararne la presenza e l'entità sul rapporto di validazione.

*Valutazione dell'effetto matrice post-estrazione.* La valutazione post-estrazione dell'effetto matrice è il metodo di eccellenza in quanto ne permette una misurazione diretta sia sugli analiti che sugli standard interni. I campioni privi di analita (neat) e i campioni fortificati post-estrazione devono essere preparati da almeno 6 lotti di campioni differenti e/o, se possibile, devono derivare da donatori differenti. La matrice priva di analita viene estratta secondo metodica. Al campione estratto viene aggiunta una quantità nota di analita. L'area dell'analita ottenuta da questo campione viene comparata con l'area ottenuta da una soluzione di analita in solvente con una concentrazione uguale al campione fortificato. L'analisi deve essere effettuata almeno su 6 lotti differenti di matrice commerciale o su 6 differenti donatori (ove disponibili) entrambi privi dell'analita. Nel caso non sia disponibile una matrice priva dell'analita, è possibile eventualmente effettuare un'analisi su 6 lotti differenti di matrice addizionati di un analita contenente isotopi stabili (come ad esempio  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) verificando accuratamente che i tempi di ritenzione di queste molecole siano identici a quelli degli analiti. In questo caso, prima di procedere con la valutazione dell'ME, è inoltre necessario verificare che l'analita non dia interferenze con l'isotopo stabile; questo per evitare che la presenza dell'analita nella matrice possa alterare i risultati del test. Per ogni lotto di matrice (o paziente) devono essere analizzate 3 differenti concentrazioni rappresentative della distribuzione dei valori biologici/patologici o terapeutici/tossici. Ad esempio, potrebbe essere utilizzato un valore pari a 3x il LLOQ o al punto più basso della curva di calibrazione (pari al valore del QC basso), uno in un punto intermedio della curva (o mediano tra LLOQ e ULOQ) e uno vicino, ma al di sotto, il punto più alto della curva di calibrazione (pari al valore del controllo di qualità alto o al ULOQ).

L'effetto matrice è calcolato indipendentemente per

ogni lotto di matrice/paziente e per ogni analita nel seguente modo:

$$ME\% = (A_{x \text{ Solvente}} / A_{x \text{ matrice}}) * 100$$

$A_{x \text{ Solvente}}$  = Area dell'analita "x" in solvente  
 $A_{x \text{ matrice}}$  = Area dell'analita "x" nel campione di matrice dopo estrazione

La media dei ME% è comunemente utilizzata per la valutazione dell'effetto matrice.

Per alcune linee guida quali quelle emanate da EMA, FDA, Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (2-5), la valutazione dell'effetto matrice percentuale è l'unica valutazione richiesta in tema di effetto matrice. Poiché la quantificazione di un analita viene effettuata come rapporto tra l'area dello stesso e uno IS, è facile comprendere come gli effetti matrice delle due molecole debbano essere messi in relazione tra loro per valutare l'effetto complessivo che le due molecole avranno sulla metodica. Su questo punto, solo le linee guida EMA forniscono una indicazione in merito, senza però entrare nello specifico (2).

La valutazione della relazione degli effetti matrice di analita e IS è particolarmente importante nel caso in cui si utilizzino IS non marcati con isotopi stabili o nel caso in cui si usino IS marcati con isotopi stabili ma con separazione con "Ultra High Performance Liquid Chromatography" (UHPLC) nella quale la differente acidità degli IS marcati con deuteri ( $^2\text{H}$ ) potrebbe dare una sufficiente separazione cromatografica tale da non sovrapporre perfettamente i cromatogrammi di IS e analita (17-19). Per questo motivo la valutazione di un effetto matrice normalizzato (nME) (7) diventa importante al fine di valutare tutti gli analiti coinvolti nel metodo quantitativo (analita e IS). La formula per il calcolo del nME è così indicata:

$$nME\% = [(A_{x \text{ Solvente}}/A_{IS \text{ Solvente}})/(A_{x \text{ Matrice}}/A_{IS \text{ Matrice}})-1]*100$$

$A_{x \text{ Solvente}}$  = Area dell'analita "x" in solvente  
 $A_{x \text{ matrice}}$  = Area dell'analita "x" nel campione di matrice dopo estrazione  
 $A_{IS \text{ Solvente}}$  = Area dell'IS dell'analita X in solvente  
 $A_{IS \text{ matrice}}$  = Area dell'IS dell'analita "x" nel campione di matrice dopo estrazione

L'effetto matrice normalizzato non deve eccedere il  $\pm 15\%$ , in caso contrario il laboratorio deve valutare l'impatto sugli altri parametri di validazione del metodo. Un ulteriore parametro da tenere in considerazione per una corretta valutazione dell'ME, è il CV% di tutti i singoli nME%. Il CV% dell'nME% rappresenta la robustezza del ME nel suo insieme. Il CV% non deve superare il 10%. Il rapporto finale di validazione del metodo deve riportare i valori di nME% e di CV% (7).

*Valutazione con infusione post-colonna.* Nel caso in cui il metodo precedentemente descritto non sia applicabile, ad esempio nel caso di composti endogeni per i quali non sia disponibile un isotopo stabile che abbia un cromatogramma perfettamente sovrapponibile

al cromatogramma dell'analita o nel caso in cui non sia possibile eliminare l'interferenza dell'analita sul suo isotopo, è possibile utilizzare il metodo della infusione post colonna. Tale metodo non è tuttavia da preferire, in quanto non fornisce un valore quantitativo dell'effetto matrice, ma definisce solo parametri qualitativi. Un campione di analita in solvente e 6 differenti lotti di matrice devono essere preparati secondo il metodo in validazione, ma senza l'aggiunta dello IS e analizzati. Contemporaneamente, una concentrazione nota di analita (o IS) viene infusa mediante una pompa siringa direttamente nell'eluente appena prima della sorgente ionica. La matrice influenzerà la ionizzazione dell'analita dispensato dalla pompa siringa producendo un cromatogramma con possibili picchi sia positivi che negativi. Tutti i campioni preparati devono essere testati a 3 differenti concentrazioni (come nel paragrafo precedente).

Poiché la valutazione del ME post-colonna è una valutazione qualitativa, all'interno del rapporto deve essere inserita una dettagliata descrizione di tutti gli analiti coinvolti (IS incluso) in termini di profilo cromatografico, tempi di ritenzione e intensità dell'effetto matrice osservato in relazione ai tempi di ritenzione dell'analita e del suo IS con osservazioni rispetto alla variazione dell'effetto matrice in base alla concentrazione. Per finire, è necessario includere una stima del rapporto dell'ME del bianco rispetto ai campioni in matrice in termini di caduta/incremento del segnale. Non essendo un metodo prettamente quantitativo, non è possibile definire dei valori di accettabilità del metodo; pertanto in caso di effetti matrice presenti ai tempi di ritenzione dell'analita e/o dello IS si consiglia di modificare le condizioni cromatografiche e/o il metodo di estrazione.

### Stabilità

Lo studio della stabilità è una parte importante del metodo di validazione al fine di garantire una corretta gestione di tutti i reagenti e dei campioni durante l'intero processo di analisi (2-5). Lo studio della stabilità deve valutare tutte le soluzioni, reagenti e campioni durante: la raccolta dei campioni (prelievo), lo stoccaggio dei campioni a breve termine, lo stoccaggio dei campioni a lungo termine, i cicli di congelamento/scongelo, lo stoccaggio dopo processamento/estrazione (prima dell'analisi). I parametri e le condizioni da valutare dovrebbero eccedere o al limite coprire i normali tempi delle procedure di campionamento e analisi (come stimato dalla normale gestione del laboratorio). In generale le condizioni minime da valutare sono: stabilità a differenti tempi di conservazione e a differenti temperature, stabilità alla luce (indiretta ed eventualmente diretta), stabilità a ripetuti cicli di congelamento/scongelo.

La stabilità deve essere analizzata su 3 aliquote indipendenti di almeno 2 concentrazioni differenti dell'analita (ad esempio uno a 3 volte il LLOQ -basso QC-, e uno vicino il ULOQ -alto QC-). Un campione è

considerato stabile alla specifica condizione in valutazione se la concentrazione media di ogni livello è entro  $\pm 15\%$  della concentrazione determinata al tempo zero rispetto alla concentrazione media degli stessi livelli preparati con reattivi freschi (2). Una valutazione della stabilità basata solo su dati pubblicati non può essere considerata completa se non sufficientemente descritta e verificata.

La stabilità delle soluzioni stock e degli standard, sia degli analiti che degli IS deve essere valutata confrontandola con soluzioni fresche (ottenute da polveri standard o soluzioni pure), valutando le condizioni descritte in seguito.

*Stabilità delle soluzioni e dei reagenti.* La stabilità di: soluzioni standard di stoccaggio di lavoro degli analiti e IS, soluzioni di standard in matrice con e senza analiti, e soluzioni di reagenti preparate in laboratorio (miscele di solventi, tamponi, soluzioni saline, etc.) devono essere valutate rispetto a soluzioni preparate al momento (da standard in polveri o liquidi). Per le condizioni, valgono quelle descritte nel paragrafo stabilità a lungo termine.

*Stabilità dopo cicli di congelamento/scongelo.* Nel caso sia necessaria una conservazione di reattivi, campioni, controlli di qualità o calibratori congelati, in particolar modo se in forma liquida e confezionati in quantitativi maggiori di un singolo utilizzo, è necessario effettuare uno studio di stabilità ai ripetuti cicli di congelamento/scongelo. La stessa aliquota di un campione QC può essere sottoposta a diversi cicli di congelamento/scongelo. Il numero di cicli di congelamento/scongelo è solitamente di 3, ma la valutazione deve essere effettuata in proporzione al confezionamento del reattivo/campione in studio e pari al suo numero massimo di potenziali cicli di scongelamento (ad esempio, con un volume 3000  $\mu\text{L}$ , e un utilizzo 100  $\mu\text{L}$ , il numero di cicli massimi: 30). Per ogni ciclo i controlli di qualità devono essere posti a scongelare a temperatura ambiente (o alla temperatura di processamento) fino a completo scongelamento. Se un'aliquota viene utilizzata per effettuare lo studio di stabilità, la restante parte deve essere nuovamente congelata almeno per 12 ore alla temperatura dichiarata di conservazione ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$  o  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ) prima di effettuare un nuovo ciclo di verifica della stabilità.

*Stabilità a breve termine e gestione del prelievo.* Al fine di valutare la stabilità del campione primario (il tubo primario di prelievo o del campionamento), bisogna aggiungere allo stesso, immediatamente dopo il prelievo (o appena possibile), una quantità nota di analita e conservarlo a temperatura ambiente ( $25\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ ) per almeno 24 ore. I periodi di tempo possono essere valutati compatibilmente con il tempo atteso di arrivo del campione dalla sede del prelievo alla sede di stoccaggio/processamento in laboratorio. In condizioni speciali, nel caso il campione debba essere spedito, o subisca un trasporto e/o nel caso la stabilità a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  sia troppo ridotta rispetto ai tempi di consegna del campione al laboratorio è necessaria una valutazione anche a  $35\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$  e/o  $4/8\text{ }^\circ\text{C}$  e/o a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Si raccomanda di valutare tempi notevolmente maggiori rispetto al tempo



stimato, in quanto i campioni che non arriveranno in laboratorio in un tempo utile rispetto ai tempi di cui è stata valutata la stabilità, saranno da considerare non conformi e quindi non utilizzabili per l'analisi.

L'analisi deve essere effettuata su una sola tipologia di prelievo; l'uso di differenti tubi di raccolta del campione (o con anticoagulanti diversi, o provette con o senza gel o con conservanti (come ad esempio sostanze riducenti) richiede una rivalutazione della stabilità dell'analita. Inoltre, nel caso si debbano usare differenti coadiuvanti o conservanti, deve essere riconsiderato l'impatto sugli altri parametri di validazione.

Il rapporto di validazione deve dichiarare le condizioni di luce nelle quali viene condotto lo studio (conservazione al buio, luce non diretta, luce diretta). Lo studio deve essere condotto alle stesse condizioni di luce per l'intera durata dello studio; eventuali altre condizioni di luce possono essere valutate e dichiarate nel rapporto.

**Stabilità a lungo termine.** Tutti i reagenti, le soluzioni, i campioni, i controlli di qualità e i calibratori devono essere sottoposti a una valutazione di stabilità a lungo termine (2, 6). Questa valutazione può essere condotta, in base al tipo di soluzione testata, da 15 giorni (come ad esempio la stabilità a lungo termine dei campioni) fino a 1 anno o più (quando si tratti di reagenti, soluzioni, controlli di qualità) a discrezione del laboratorio. La stabilità a lungo termine deve essere testata a  $25 \pm 5$  °C. Sulla base dei risultati della stabilità a breve termine, o dei risultati preliminari ottenuti a  $25 \pm 5$  °C, ulteriori studi possono essere effettuati al fine di valutare temperature più basse (4/8 °C, -20 °C, -80 °C). Nel caso vengano utilizzati reattivi, campioni, controlli di qualità o calibratori liofilizzati, lo studio di stabilità a lungo termine deve essere condotto anche sui rispettivi risospesi/solubilizzati.

Il rapporto di validazione deve dichiarare le condizioni di luce a cui viene condotto lo studio (es. conservazione al buio, luce non diretta, luce diretta). Anche nella valutazione a lungo termine, lo studio deve essere condotto alle stesse condizioni di luce per l'intera durata dello studio; eventuali altre condizioni di luce possono essere valutate e dichiarate nel rapporto.

**Stabilità dopo processamento/estrazione (prima dell'analisi).** Una volta processato/estratto, il campione può essere analizzato dopo un certo periodo di tempo. Questo può essere dovuto al tempo di attesa nell'autocampionatore, oppure può essere necessario rianalizzare gli stessi campioni il giorno successivo o verificarsi una momentanea impossibilità di utilizzare lo strumento. Lo studio di stabilità viene solitamente condotto a 4-8 °C che è la classica temperatura di esercizio di un autocampionatore, per un minimo di 48 ore. Lo studio può anche essere condotto a temperature differenti in base alle necessità del laboratorio; nel caso sia prevista la conservazione previo congelamento, è necessario effettuare uno studio di stabilità sui cicli di congelamento/scongelo del campione processato/estratto.

Come per gli studi a breve e a lungo termine, anche

in questo caso il rapporto di validazione deve dichiarare le condizioni di luce nelle quali viene condotto lo studio, ad esempio, conservazione al buio, protetto dalla luce conservato in recipiente scuro, a luce indiretta, a luce diretta. Lo studio deve essere condotto alle stesse condizioni di luce per l'intera durata dello studio; eventuali altre condizioni di luce possono essere valutate e dichiarate nel rapporto.

### Validazione parziale e kit commerciali

I kit commerciali (IVD) devono essere progettati, prodotti e validati seguendo la normativa europea di riferimento del maggio 2017 (6), ove, tra le varie novità, è stata introdotto l'obbligo di effettuare validazione clinica del kit. Nell'ambito della validazione di tali kit, è opportuno fare riferimento alle attuali linee guida e alla normativa vigente (2, 4, 6).

La validazione parziale deve essere applicata in caso di modifiche minori a metodi bioanalitici già validati in laboratorio oppure quando si utilizzano kit commerciali, possibilmente marcati CE (CE-IVD), ai quali siano state apportate modifiche. Modifiche o cambiamenti a metodi bioanalitici che rientrano in questa categoria includono: trasferimento di metodi bioanalitici tra laboratori o operatori; modifiche della metodologia analitica (cambio di sistema di rivelazione o di altro componente strumentale e/o configurazione, inclusa la piattaforma software); diverso anticoagulante (da eparina ad EDTA); diversa matrice impiegata (passaggio da urine a plasma); modifiche nelle procedure di processamento del campione o delle modalità di campionamento (impiego di dispositivi per matrici essiccate); modifiche nel volume di campione utilizzato (riduzione del volume in pediatria). Lo scopo della validazione parziale è quello di dimostrare che le modifiche applicate al metodo non inficiano le caratteristiche del metodo stesso.

Le validazioni parziali possono variare dalla sola rivalutazione di accuratezza e precisione entro e tra le serie, a una validazione quasi completa. La decisione su quali caratteristiche del metodo richiedano una validazione aggiuntiva va presa in base a considerazioni logiche su quelli che, presumibilmente, sono i parametri che possono essere stati inficiati dalle modifiche attuate al metodo. Ad esempio, una modifica alla fase stazionaria della colonna analitica o alla composizione della fase mobile potrebbero modificare la linearità e/o la selettività del metodo e/o l'effetto matrice che andrebbero quindi opportunamente rivalutate.

È importante sottolineare che una validazione parziale del metodo andrebbe effettuata ogni volta che si adotti un nuovo kit commerciale presso il proprio laboratorio. Tali metodi potrebbero essere stati infatti validati su strumentazioni completamente o parzialmente differenti da quelli effettivamente in uso, che potrebbero presentare caratteristiche analitiche diverse in termini di intervallo di misura, linearità, riproducibilità e così via.

## Cross validazione

Per meglio comprendere gli argomenti descritti in questa sezione fare riferimento in particolare alle linee guida EMA (2).

La cross-validazione è una comparazione dei parametri di validazione tra più metodi bioanalitici, o tra diversi laboratori, che deve essere effettuata quando due o più metodi bioanalitici vengono utilizzati per generare dati all'interno dello stesso studio; quando lo stesso metodo bioanalitico viene utilizzato da due laboratori differenti per generare dati all'interno dello stesso studio; quando vengano effettuate modifiche considerate minori a un metodo esistente

Per effettuare la cross-validazione è necessario analizzare uno stesso set/lotto di QC o di campioni clinici utilizzando entrambi i metodi da confrontare. Per i QC l'accuratezza media ottenuta per entrambi i metodi deve essere entro il 15%. Per i campioni clinici la differenza tra i due valori ottenuti deve essere all'interno del 20% della media per almeno il 67% delle misure effettuate (2).

## Ri-analisi di campioni clinici

I calibratori e i QC utilizzati durante la validazione potrebbero non essere sufficienti per mimare i campioni clinici reali in quanto potrebbero esserci differenze in grado di inficiare l'accuratezza e la precisione dell'analita. Tra queste possiamo elencare differenze nel legame con le proteine, conversione in metaboliti o presenza di co-mediezioni nei campioni reali. È perciò necessario valutare l'accuratezza nei campioni reali ri-analizzando i campioni clinici in sedute di lavoro differenti in giorni differenti utilizzando curve di calibrazione preparate invece ex-novo. In linea di massima, si raccomanda di ri-analizzare il 10% dei campioni nel caso in cui il numero totale dei campioni sia meno di 1000 e il 5% del numero dei campioni oltre i 1000 (2). È inoltre consigliabile analizzare campioni che coprano tutto l'intervallo delle concentrazioni attese.

La concentrazione ottenuta dalla prima analisi (originale) e quella ottenuta nella ri-analisi (ripetizione) dovrebbero essere all'interno del 20% della loro media per almeno il 67% delle ripetizioni effettuate.

La differenza percentuale dei risultati è determinata dalla seguente equazione:

$$(Ripetizione - Originale) * 100 / Media$$

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le analisi in LC-MS sono diventate uno strumento primario nelle determinazioni di medicina di laboratorio.

La comprensione della terminologia utilizzata, attraverso i regolamenti e le direttive provenienti da diversi Paesi, è diventata una sfida per i ricercatori e gli operatori bioanalitici. Fino ad oggi infatti, i ricercatori coinvolti nella validazione di metodi bioanalitici hanno utilizzato una serie di terminologie non univoche e chiare. Ad oggi, sono stati pubblicati lavori che

utilizzano protocolli per la validazione LC-MS con diversi livelli di accettazione. Questo causa una mancanza di armonizzazione dei risultati nonostante la tecnologia LC-MS sia sensibile e specifica.

Attualmente, non sono ancora state pubblicate in Italia delle linee guida dedicate alla validazione di metodi bioanalitici. Chi vuole sviluppare e validare un metodo quantitativo in LC-MS o LC-MS/MS deve fare riferimento alle più importanti linee guida internazionali (2-5), le quali però, in alcuni casi non sono abbastanza specifiche per la cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa o mancano di indicazioni specifiche per gli analiti endogeni. In alcune linee guida vi sono, infatti, lacune evidenti sulla validazione dei metodi in cromatografia accoppiati a spettrometria di massa (3, 4). Ad esempio, non sempre viene considerato che i campioni dei pazienti possono presentare delle alterazioni, come nel caso di campioni iperlipidemici, iperbilirubinemici o emolizzati (20). Queste possibili alterazioni devono essere assolutamente considerate nel processo di validazione di un metodo sia "home made" che commerciale e i risultati devono essere pubblicati o riportati nel rapporto di validazione e/o nel foglio informativo del kit diagnostico IVD (6).

Una limitazione aggiuntiva delle attuali linee guida, è l'assenza di informazioni sulla validazione di un metodo quantitativo per molecole endogene (2-5). Con questo documento, il gruppo di studio "La spettrometria di massa: applicazioni e innovazioni diagnostiche" di SIBioC, ha cercato di colmare questa lacuna elencando i possibili passi da seguire e indicando alcuni protocolli di comportamento per la validazione di metodi per le molecole endogene.

Nel caso dei kit (CE-IVD o meno) usati per le analisi LC-MS in biochimica clinica, questi non sono sempre validati su tutti gli strumenti attualmente sul mercato (e sarebbe impossibile considerando le innumerevoli configurazioni e combinazioni strumentali possibili oggi e nel prossimo futuro). Questi kit (anche quelli con marchio CE-IVD) necessitano però almeno di una validazione parziale sugli strumenti disponibili in ciascun laboratorio, per rivalutare le caratteristiche dei metodi e ridefinire i possibili limiti.

In conclusione, le nuove regole e i protocolli riportati in questo lavoro non intendono sovrapporsi alle attuali linee guida, ma piuttosto possono dare un apporto positivo e aiutare coloro che eseguono la validazione di metodi LC-MS, sia artigianali che commerciali, raccomandando alcuni ulteriori passaggi da effettuare durante la validazione, con l'obiettivo finale di fornire i migliori risultati analitici possibili.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Dott. Amedeo De Nicolò (Università di Torino) per le valutazioni statistiche, i suggerimenti e il supporto, la Dott.ssa Cinzia Benagli (Ente Ospedaliero Cantonale - Bellinzona) e la Dott.ssa Debora Pensi (Università di Torino) per la lettura critica del manoscritto.

**CONFLITTO DI INTERESSI**

Nessuno.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Vogeser M, Seger C. Pitfalls associated with the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clin Chem* 2010;56:1234-44.
2. European Medicine Agency Guideline on bioanalytical method validation, 2011. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf)
3. Food and Drugs Administration Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (Rev. 1), 2013 <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf>
4. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). Standard practices for method validation in forensic toxicology. *J Anal Toxicol* 2013;37:452-74
5. Clinical and Laboratory Standard Institute. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods. Approved Guideline C62-A. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014. [https://clsi.org/media/1346/c62a\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1346/c62a_sample.pdf)
6. Gazzetta Ufficiale del parlamento Europeo e del Consiglio. Regolamento (Ue) 2017/746 del 5 Aprile 2017 relativo ai dispositivi medico-diagnostici in vitro. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0746&from=EN>
7. Nicolò A, Cantu M, D'Avolio A. Matrix effect management in liquid chromatography mass spectrometry: the internal standard normalized matrix effect. *Bioanalysis* 2017;9:1093-105.
8. Baietto L, Simiele M, D'Avolio A. How effective is the use of DBS and DPS as tools to encourage widespread therapeutic drug monitoring? *Bioanalysis* 2014;6:425-7.
9. D'Avolio A, Simiele M, Siccardi M, et al. HPLC-MS method for the quantification of nine anti-HIV drugs from dry plasma spot on glass filter and their long term stability in different conditions. *J Pharm Biomed Anal* 2010;52:774-80.
10. Zimmer JS, Christianson CD, Johnson CJ, et al. Recent advances in the bioanalytical applications of dried matrix spotting for the analysis of drugs and their metabolites. *Bioanalysis* 2013;5:2581-8.
11. McCloskey LJ, Yoo JH, Stickle DF. Interpatient distributions of bloodspot area per fixed volume of application: comparison between filter paper and non-cellulose dried matrix spotting cards. *Clin Chim Acta* 2014;437:187-90.
12. Cangemi G, Barco S, Castagnola E, et al. Development and validation of UHPLC-MS/MS methods for the quantification of colistin in plasma and dried plasma spots. *J Pharm Biomed Anal* 2016;129:551-7.
13. D'Avolio A, Sciandra M, Siccardi M, et al. A new assay based on solid-phase extraction procedure with LC-MS to measure plasmatic concentrations of tenofovir and emtricitabine in HIV infected patients. *J Chromatogr Sci* 2008;46:524-8.
14. D'Avolio A, Siccardi M, Sciandra M, et al. HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the new HIV protease inhibitor darunavir, and 11 other antiretroviral agents in plasma of HIV-infected patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;859:234-40.
15. D'Avolio A, De Nicolò A, Agnesod D, et al. A UPLC-MS/MS method for the simultaneous plasma quantification of all isomeric forms of the new anti-HCV protease inhibitors boceprevir and telaprevir. *J Pharm Biomed Anal* 2013;78-79:217-23.
16. Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 2005;38:328-34.
17. Iyer SS, Zhang ZP, Kellogg GE, et al. Evaluation of deuterium isotope effects in normal-phase LC-MS-MS separations using a molecular modeling approach. *J Chromatogr Sci* 2004;42:383-7.
18. Jemal M, Schuster A, Whigan DB. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable isotope analog internal standard. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003;17:1723-34.
19. Wang S, Cyronak M, Yang E. Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2007;43:701-7.
20. Perrin P, Cuerq C, Draï J, et al. T165. Hemolysis, lipemia and bilirubinemia: what impact on vitamins A, E, K, B6, B9, B12, C, beta-carotene and homocysteine concentrations? *Clin Chem Lab Med* 2015;53(SS):s763.